



# Effet des agonistes des TRL sur la production des FRO par la NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles humains

Karama Makni Makni Maalej

## ► To cite this version:

Karama Makni Makni Maalej. Effet des agonistes des TRL sur la production des FRO par la NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles humains. Immunologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T037 . tel-01239582

**HAL Id: tel-01239582**

**<https://theses.hal.science/tel-01239582>**

Submitted on 14 Dec 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE PARIS SUD11 ET UNIVERSITE DE SFAX**

**FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD ET L'ENIS**

Ecole Doctorale 419 : Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie

Ecole Doctorale Sciences et Technologies (EDST)

**THESE**

**(Cotutelle internationale de thèse)**

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université Paris sud11 et de l'ENIS**

**Discipline : IMMUNOLOGIE**

Présentée et soutenue publiquement par

**KARAMA MAKNI-MAALEJ**

Le 07 septembre 2012

---

**Effet des agonistes des TLR sur la production des formes réactives  
de l'oxygène par la NADPH oxydase des polynucléaires  
neutrophiles humains**

---

**Jury :**

**Professeur Mohammed TAOUIS**

**Président**

**Docteur Michel MALLAT**

**Rapporteur**

**Professeur Ali GARGOURI**

**Rapporteur**

**Docteur Corinne DUPUY**

**Examinatrice**

**Docteur Jamel EL BENNA**

**Directeur de thèse**

**Professeur Hammadi ATTIA**

**Co-directeur de thèse**

# REMERCIEMENTS

*Mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de mes formidables années de thèse*

J'exprime mes profonds remerciements à mon directeur de thèse, le docteur **Jamel EL BENNA** pour l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer. Tout au long de la réalisation de cette thèse, il a toujours été disponible pour des riches et fructueuses discussions. Son enthousiasme, son expertise scientifiques et son œil critique m'ont été très précieux pour structurer et améliorer la qualité de ce travail.

Ensuite je tiens à remercier le Professeur **Marie-Anne GOUGEROT-POCIDALO** d'avoir partagé ses connaissances sur les neutrophiles et les TLR, pour tous les conseils qui m'ont aidée à bien réaliser ce travail. Je la remercie aussi de sa disponibilité pour la relecture de mon manuscrit.

Dans le cadre d'une cotutelle de thèse je tiens à remercier le professeur **Hammadi ATTIA** et le docteur **Saloua LASSOUED** de leur coopération pour le bon déroulement de ce travail.

Je remercie les membres de jury de ma thèse le professeur **Ali GARGOURI** et le docteur **Michel MALLAT** d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de le corriger en tant que rapporteurs en dépit de la charge de travail quotidienne. Je remercie également le docteur **Corinne DUPUY** d'examiner cette thèse. Je remercie tout particulièrement le professeur **Mohammed TAOUIS** d'avoir accepté la présidence de ce jury de thèse.

Mes remerciements à tous les membres de l'équipe « Phagocytes, cellules épithéliales et NADPH oxydase dans l'immunité innée et l'inflammation » qui étaient membres de ma famille avec lesquels j'ai passé quatre chaleureuses années. A notre mère **Michèle** qui grâce à elle régnait la joie et la vivacité dans notre bureau. Sans sa gentillesse et sans son soutien l'ambiance n'aurait pas été pareille dans notre labo. Mes remerciements spéciaux à mon petit frère **Loïc** mon sauveur en informatique, à mon accompagnatrice de parcours recherche scientifique depuis 2008, **Maya**. A mes collègues **Tarek, Riad, Margarita** qui ont été là

pour mes urgences techniques et qui m'ont beaucoup aidée pendant les moments difficiles. J'exprime aussi ma gratitude envers mes autres collègues qui ont travaillé à mes côtés, notamment **Pia, Sahra, Soumeya, Imène et Mahmoud** et qui m'ont motivée à travailler. Je remercie aussi les autres membres de l'équipe : **Yolande KROVIARSKI** et **Odile BOURNIER** pour leur gentillesse, **Françoise BRAUT** pour ça délicatesse infinie, **Jean-Claude Marie** pour sa bonne humeur interminable, **Axel PERIANIN** pour ses critiques, **My-  
chan DANG** pour ses propositions scientifiques incontournables lors des réunions du labo, **Fathi DRISS** pour son esprit créatif et innovant, **Grégory PINON** pour ses idées riches et ses discussions profondes lors des séminaires internes de l'équipe, je remercie **Eric CHASTRE** et **Larissa KOTELEVETS**.

Je remercie aussi **Nicaise COMIN, Marie-Hélène CANOGA, Julien PUTHOD** et **Margot SAUVADET** qui ont facilité les démarches administratives.

Je remercie **toutes les personnes qui ont fait don de leur sang** pour la recherche médicale.

*Parce qu'une thèse ne se fait pas seulement par le travail qui suit, je voudrais adresser mes plus sincères remerciements à mes parents **Mongi et Sarra**, qui m'ont soutenue depuis mon enfance, qui ont contribué à mon progrès et qui m'ont continuellement et quotidiennement encouragée.*

*Un MERCI particulier à mon cher mari **Mohamed** tant pour son soutien moral que matériel, sans qui l'aboutissement de cette thèse aurait été compromis !*

*Merci à mon frère **Zaatar** qui a contribué à ma « maturation ».*

*Enfin, finalement.....Je dédie cette thèse à mon fils **Wassim** dont sa présence, son sourire et sa patience d'avoir une maman étudiante m'ont aidé à surmonter toutes les difficultés rencontrées au cours de cette thèse.*

« La richesse de l'imagination est la principale cause de la pauvreté dans les sciences. Le principal but de la science n'est pas d'ouvrir à une sagesse infinie, mais de tracer les limites de l'erreur infinie. »

Bertolt Brecht, La vie de Galilée.

## INTRODUCTION GENERALE

La production des formes réactives de l'oxygène (FRO) par les polynucléaires neutrophiles joue un rôle essentiel dans la lutte anti-infectieuse. Cependant, produites de façon excessive les FRO participent à des lésions tissulaires à l'origine de maladies inflammatoires. Les FRO sont produites par un système enzymatique appelé NADPH oxydase ou NOX2. L'activation de la NADPH oxydase des phagocytes induite par un grand nombre de facteurs solubles et particuliers (comme le N-formyl peptide d'origine bactérienne ; le formyl-Methionine-Leucine-Phénylalanine (fMLF), le zymosan opsonisé, des bactéries opsonisées...), peut être augmentée par un prétraitement des phagocytes avec des agents " primants " comme certaines cytokines pro-inflammatoires (GM-CSF, TNF $\alpha$  et IL-8) et certaines molécules d'origine bactérienne comme le LPS. Ces agents n'induisent pas la production des FRO par elles-mêmes mais augmentent fortement leur production en réponse à un deuxième stimulus appliqué ultérieurement, préparant ainsi la cellule pour une réponse plus rapide et plus efficace.

Les TLR (TLR1 à 10) sont des récepteurs exprimés à la surface de nombreuses cellules dont les cellules immunitaires ; ils détectent des motifs conservés au cours de l'évolution des agents pathogènes appelés PAMPs pour "pathogen-associated molecular patterns", des protéines modifiées reconnues comme étrangères, des lipides oxydés, des ligands endogènes. A l'exception du LPS, ligand du TLR4, l'effet des agonistes des TLR sur la production des FRO par les neutrophiles et les mécanismes impliqués ne sont pas connus.

**Le but de ma thèse est d'étudier l'effet des agonistes de TLR sur la production des FRO par la NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles humains et les mécanismes moléculaires impliqués. La connaissance précise des mécanismes conduisant à l'hyperactivation des neutrophiles au sein d'un site inflammatoire permettrait d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques de première importance afin de moduler les réponses inflammatoires pathologiques.**

Mes résultats montrent que :

- 1) L'agoniste des TLR7/8, le CL097 augmente fortement la production des FRO par les PN stimulés par le fMLF. Cet effet est contrôlé par la phosphorylation de la p47phox (par les MAPK et les PKC) et par la proline isomérase Pin1.
- 2) Le CL075 (agoniste spécifique du TLR8) induit un priming de la production des FRO par les PN stimulés par le fMLF comparable à celui induit par le CL097, alors que la Loxoribine (agoniste spécifique du TLR7) n'a pas d'effet.
- 3) Le zymosan non opsonisé (agoniste de TLR2) induit seul une forte production des FRO par la NADPH oxydase des neutrophiles. Cet effet est contrôlé par la phosphorylation de la p47phox (par les MAPK et les PKC) et par l'activation de petite protéine cytosolique Rac2.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>A. LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES (PN) ; CELLULES CLES DE L'IMMUNITE INNEE .....</b>	<b>13</b>
<b>I. Production des PN par l'organisme .....</b>	<b>13</b>
<b>II. Fonctions cellulaires des PN.....</b>	<b>17</b>
<b>1. Le chimiotactisme ou migration cellulaire dirigée.....</b>	<b>17</b>
<b>2. La reconnaissance et la phagocytose de l'agent pathogène.....</b>	<b>18</b>
a) Reconnaissance de l'agent pathogène .....	18
b) Phagocytose de l'agent pathogène .....	19
<b>3. La destruction de l'agent pathogène .....</b>	<b>20</b>
❖ Mécanisme indépendant de l'oxygène ; la dégranulation .....	20
❖ Mécanisme dépendant de l'oxygène ; l'explosion oxydative par la NADPH oxydase phagocytaire (NOX2) .....	22
❖ Bactéricidie par les NET'S (Neutrophil Extracellular Traps) .....	23
<b>4. La production de médiateurs de l'inflammation par les neutrophiles.....</b>	<b>24</b>
<b>III. Résolution de l'inflammation et apoptose des PN.....</b>	<b>26</b>
<b>IV. Rôle des neutrophiles dans les pathologies .....</b>	<b>27</b>
1. Les maladies inflammatoires.....	27
2. Les Déficiets immunitaires.....	28
<b>B. LES RECEPTEURS TOLL-LIKE (TLR) .....</b>	<b>30</b>
<b>I. Phylogénie des TLRs.....</b>	<b>30</b>
<b>II. Structure des TLRs (figure 6) .....</b>	<b>31</b>
1. Domaine extracellulaire.....	31
2. Domaine intracellulaire ou domaine TIR .....	32
<b>III. Expression des TLRs .....</b>	<b>32</b>
1. Localisation cellulaire .....	32
2. Expression cellulaire .....	33
<b>IV. La reconnaissance des agents pathogène par les TLR et leur activation.....</b>	<b>33</b>

1.	TLR2, TLR1/TLR2 et TLR6/TLR2 .....	36
2.	TLR3 .....	36
3.	TLR4 .....	37
4.	TLR5 .....	37
5.	TLR7 et TLR8 .....	38
6.	TLR9 .....	38
7.	TLR11 .....	39
V.	TLRs et ligands endogènes .....	39
VI.	Signalisation des TLR.....	40
1.	Voie de signalisation MyD88 dépendante .....	41
2.	Voie de signalisation TRIF-dépendante.....	43
C.	LA NADPH OXYDASE PHAGOCYTAIRE.....	44
I.	Structure .....	45
1.	Le flavocytochrome b558 .....	45
c)	NOX2/gp91phox .....	46
d)	Sous-unité p22phox.....	47
1.	Les facteurs cytosoliques de la NADPH oxydase phagocytaire .....	48
a)	Sous-unité p47phox.....	48
b)	Sous-unité p67phox.....	49
c)	Sous-unité p40phox.....	50
d)	Sous-unité Rac.....	50
II.	Les kinases qui contrôlent la phosphorylation des composants de l'oxydase et son activation .....	51
1.	La protéine kinase C.....	51
2.	Les MAP kinases .....	53
3.	Les PI3 kinases .....	53
4.	La protéine kinase A .....	54
III.	Les voies d'activation de la NADPH oxydase du PN (exemples fMLF et PMA) 55	
IV.	Activation du complexe NADPH oxydase.....	56
1.	Généralités .....	56



2.	La NADPH oxydase au repos.....	58
3.	Le priming de la NADPH oxydase .....	59
4.	Activation de la NADPH oxydase.....	61
V.	Phosphorylation des sous unités de la NADPH oxydases.....	61
1.	Phosphorylation de la p47phox.....	61
2.	Phosphorylation de la p67phox.....	64
3.	Phosphorylation de la p40phox.....	65
4.	Phosphorylation de la p22phox.....	65
5.	Phosphorylation de la gp91phox (NOX2) .....	66
6.	Activation de rac2 .....	66
VI.	Interactions moléculaires des sous-unités de la NADPH oxydase lors de son activation	66
VII.	Désensibilisation de la production des FRO par les PN .....	68
VIII.	Les pathologies associées à une dérégulation de la NADPH oxydase.....	69
1.	La polyarthrite rhumatoïde (PR) .....	69
2.	La Granulomatose septique chronique .....	70
D.	GENERALITES SUR LES PEPTIDYL-PROLYLE CIS/TRANS ISOMERASE.....	71
I.	La proline isomérase Pin1 .....	72
1.	Structure de Pin1 .....	73
2.	Fonction de pin1 .....	73
3.	Régulation de Pin1 .....	76
	TRAVAUX DE RECHERCHE .....	77
	Article 1 : Le CL097, un agonist des TLR 7/8, induit une augmentation de l'activation de la NADPH oxydase stimulée par le fMLF dans les neutrophiles humains: Rôle critique de la phosphorylation de la p47phox et de la proline isomérase Pin1 .....	80
	Le CL075, agoniste du TLR 8 mais pas la loxoribine, agoniste de TLR7, induit une augmentation de l'activation de la NADPH oxydase stimulée par le fMLF dans les neutrophiles humains.....	111
	Article 2 : Le Zymosan, une préparation des parois de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , induit l'activation de la NADPH oxydase dans les neutrophiles humains en induisant la phosphorylation de la p47phox et l'activation de Rac2. ....	125

<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>148</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>162</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>190</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>192</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acide arachidonique
aa	acide aminé
AID	Atypical PKC-interaction domain
AIR	auto-inhibitory region
ARNm	ARN messagers
BPI	Bactericidal permeability increasing protein
C5a	Fraction 5 du complément activé
CD	Cluster of differentiation
CDK	cyclin-dependant kinases
CGD	Chronic granulomatous disease
CLA	Conjugated linoleic acid
CLnA	Conjugated linolenic acid
CR1	Récepteur du complément
CR3	Récepteur de la fraction 3 du complément
CYBA	Cytochrome b <sub>558</sub> alpha chain
CYBB	Cytochrome b <sub>558</sub> beta chain
Cyto B	Cytochalasine B
DAG	1,2-diacylglycerol
DHA	Acide docosahexaénoïque
DUOX	Dual Oxidase
EPA	Acide eicosapentaénoïque
Erk	Extracellular signal regulated kinase
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FcγR	Récepteur des immunoglobulines
FKBP	FK506-binding proteins
fMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FPR	Récepteur du fMLP
FRO	Formes réactives de l'oxygène
GAP	GTP activating protein
G-CSF	Granulocyte - Colony stimulating factor

GDP	Guanosine diphosphate
GEF	GTP exchange factor
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage- Colony stimulating factor
GTP	Guanosine triphosphate
HOCI	Acide hypochlorique
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)
IL-	Interleukine
LIP	Lambda interacting protein
LOX	5-lipo-oxygénase
LT	leucotriènes
LTB <sub>4</sub>	leucotriène B <sub>4</sub>
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen extracellular kinase
MICI	Maladies inflammatoires chronique de l'intestin
MPO	Myéloperoxydase
NADPH	Nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate (réduit)
NCF1	Neutrophil cytosolic factor 1
NO	Monoxyde d'azote
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoxyde
OH°	Radical hydroxyle
PA	Acide phosphatidique
PAF	Platelet activating factor
PAMP	Pathogen recognition molecular patterns
PB1	Phox and Bem1p domain
PC	Phox and cdc42 domain
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
Phox	Phagocyte oxidase
pI	Point isoélectrique
PI	phosphoinositides
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
Pin1	peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1

PIP3	Phosphatidylinositol 3 phosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PN	Polynucléaire neutrophile
PPIases	peptidyl-prolyl <i>cis/trans</i> isomérases
PRR	Pattern-Recognition Receptors
PRR	Proline rich region
PS	Phosphatidyl sérine
PTP	Protéine tyrosine phosphatase
PX	Phox homology domain
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RGS	regulatory G protein signaling
Rho-GDI	Rho GDP-dissociation inhibitor
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
SER	Sérine
SH3	Src homology domain
SOD	Superoxyde dismutase
TLR	Toll-like receptor
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TPR	Tetratricopeptide repeated doma

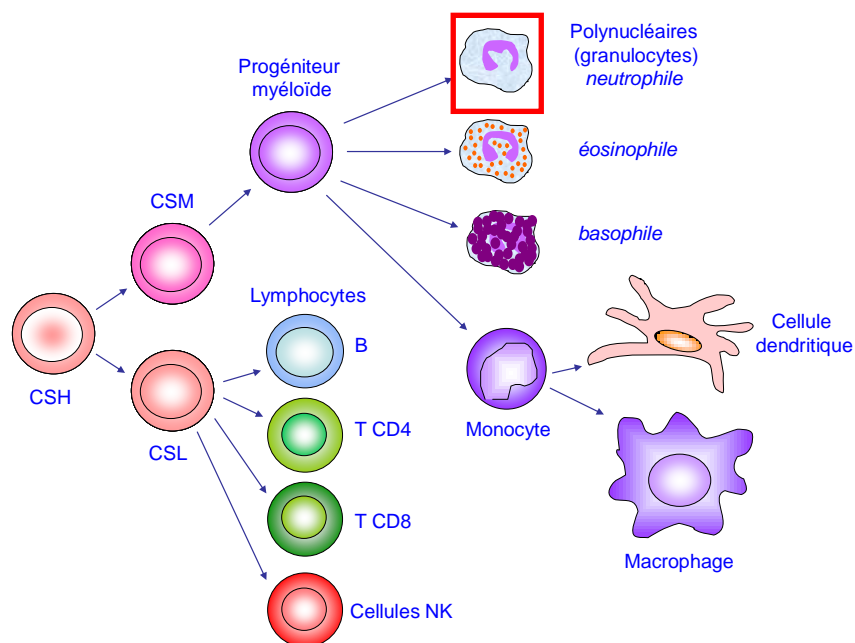
## **A. LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES (PN) ; CELLULES CLES DE L'IMMUNITE INNEE**

### **I. Production des PN par l'organisme**

Les cellules circulantes du sang assurent des fonctions vitales de l'organisme comme la respiration (globules rouges), la coagulation (plaquettes), et la défense contre les agents pathogènes (leucocytes). Ces cellules sanguines ont des durées de vie très variables qui peut aller d'une journée à plusieurs mois, l'organisme doit donc assurer chaque jour leur renouvellement de façon hautement contrôlée afin de maintenir une concentration sanguine normale. L'hématopoïèse est le processus de production des cellules sanguines qui démarre chez l'homme dans le sac vitellin après 6-8 semaines de gestation, puis dans le foie fœtal, la rate et la moelle osseuse. Chez l'homme adulte, l'hématopoïèse n'a lieu que dans la moelle osseuse. La prolifération et la différenciation d'une cellule souche totipotente hématopoïétique nommée HPP-CFC (High proliferative potential-Colony forming cell) qui a une forte capacité d'autoprolifération et de différenciation, donne naissance à différents progéniteurs qui peuvent être classés en deux familles : ceux qui proviennent d'une cellule souche myéloïde et donnent naissance aux polynucléaires, aux monocytes/macrophages, aux cellules dendritiques, aux érythrocytes et aux plaquettes ; ceux qui proviennent d'une cellule souche lymphoïdes donnant naissance aux lymphocytes T, B et NK (Natural Killer). Les progéniteurs myéloïdes se différencient en plusieurs types cellulaires sous l'influence de l'environnement stromal et de facteurs de croissance comme le GM-CSF (**G**ranulocyte **M**onocyte-**C**olony **S**timulating **F**actor). Une première étape correspond à un stade de progéniteur commun aux polynucléaires et aux monocytes. Les polynucléaires se différencient ensuite sous l'influence du G-CSF (**G**ranulocyte-**C**olony **S**timulating **F**actor), et les phagocytes mononucléés sous l'influence du M-CSF (**M**onocyte-**C**olony **S**timulating **F**actor). Selon la nature de leur granulations on distingue des Polynucléaires (ou Granulocytes), Neutrophiles (PN), Eosinophiles (PE) et Basophiles (PB). Les précurseurs tardifs de type CFU-G (Colony Forming Unit-Granulocyte), CFU-Eo (Colony Forming Unit-Eosinophils) et CFU-B (Colony Forming Unit-Basophiles) donneront respectivement des PN, des PE et des PB. L'ensemble des précurseurs tardifs donnent les promyélocytes qui donnent à leur tour des myélocytes possédants des granulations différentes selon le polynucléaire. Les myélocytes donnent des métamyélocytes, qui vont eux-mêmes être à l'origine des polynucléaires matures. Les polynucléaires matures passent de la moelle osseuse (secteur

médullaire) vers le sang (secteur vasculaire) par diapédèse. Les polynucléaires neutrophiles ont un noyau comportant 3 à 5 lobes et des granulations qui prennent les colorants acides et basiques pour aboutir à une teinte beige. Les polynucléaires éosinophiles ont un noyau bilobé et des granulations prenant les colorants acides en particulier l'éosine de couleur orangée. Les polynucléaires basophiles ont des granulations prenant les colorants basiques et apparaissent violet foncé au MGG.

Les polynucléaires neutrophiles sont des cellules phagocytaires, ce qui n'est pas le cas des éosinophiles ni des basophiles qui ont surtout une capacité d'exocytose, libérant à l'extérieur le contenu de leurs granulations. Le processus de production des granulocytes la granulopoïèse, dure environ 11 jours pour les PN.

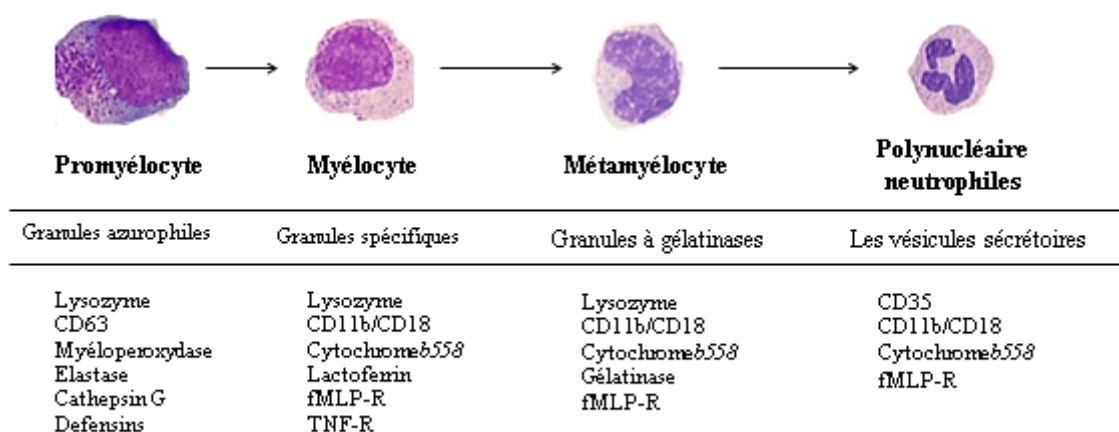


**Figure 1. Production des neutrophiles (encadrés en rouge) au cours de l'hématopoïèse.**  
 CSH= Cellule souche hématopoïétique ; CSM : cellule souche myéloïde ; CSL : cellule souche lymphoïde

Les granulations ou granules des PN sont de différentes natures et apparaissent successivement au cours de la granulopoïèse: On distingue schématiquement les granulations azurophiles ou primaires, les granulations spécifiques (secondaires) qui définissent le type du polynucléaire, ici le neutrophile, les granulations contenant de la gélatinase (tertiaires) et les vésicules sécrétoires. Cette classification est bien sûr à moduler par une certaine hétérogénéité des granulations qui peuvent être sous-divisées selon la présence ou l'absence d'autres protéines (Feldhaus et al., 2002). Les granulations sont définies par leur contenu en protéines et par le moment précis de la granulopoïèse où ces protéines sont synthétisées. Le contenu de ces granulations joue un rôle majeur, dans les différentes étapes fonctionnelles des PN (Tableau1). Sous l'effet d'un stimulus dégranulant, une décompartmentalisation permet de déclencher rapidement des fonctions effectrices. La facilité à dégranuler varie selon la densité de certaines protéines de fusion à la surface des granulations. Ainsi la mobilisation des granulations concernera dans un ordre décroissant d'abord les vésicules sécrétoires, les gélatinases, puis les granulations spécifiques et enfin les granulations azurophiles.

La mobilisation des granulations contenant des molécules ancrées dans leur membrane induit une fusion entre cette membrane et la membrane plasmique augmentant ainsi leur expression à ce niveau. Ces phénomènes sont bien décrits pour le récepteur des N-formyl peptides, dont le prototype est le formyl-méthionyl-leucyl- phényalanine (fMLF) et pour la  $\beta$ 2-intégrine CD11b/CD18 intervenant dans la plupart des étapes fonctionnelles du PN. La dégranulation permet aussi le transfert du cytochrome b558 sous-unité catalytique de la NADPH oxydase, du pool granulaire vers la membrane plasmique ou phagosomale. De plus, cette dégranulation permet une libération dans le phagosome et dans le milieu extracellulaire de molécules liées à la matrice des granulations et jouant un rôle dans les fonctions mêmes du PN : molécules bactéricides, myéloperoxydase (MPO), enzymes, médiateurs de l'inflammation, cytokines pro et anti-inflammatoires intervenant dans la régulation des réponses immunitaires de l'hôte et dans les réparations tissulaires.





**Tableau 1. Granulopoïese ; contenu des granulations des PN.**

Les neutrophiles ou polynucléaires neutrophiles sont les leucocytes sanguins les plus nombreux : ils représentent 50 à 75% des leucocytes sanguins (4000 à 10 000 / $\mu$ l). Les polynucléaires neutrophiles ont une demi-vie de 6 à 12 heures dans le sang circulant. Il existe deux populations de neutrophiles, l'une est constituée de neutrophiles circulants (environ 50 %) et l'autre est constituée de neutrophiles qui adhèrent faiblement aux parois des vaisseaux surtout dans la rate, le foie et les poumons, ces PN sont appelés et représente une quantité égale au secteur circulant. Ces polynucléaires marginés sont fonctionnels et immédiatement disponibles. Ils migrent dans les tissus au niveau des capillaires et des veinules post-capillaires. L'ensemble des fonctions physiologiques des PN s'exerce donc dans les tissus où, en l'absence de stimulus inflammatoire, les PN meurent spontanément par apoptose en moins de trois jours et sont phagocytés par les macrophages résidents, évitant ainsi la libération de leur contenu toxique. Lorsqu'il existe un foyer inflammatoire, différents stimuli sont libérés induisant une migration rapide et massive des PN du sang circulant en direction du foyer inflammatoire où ces cellules vont exercer leur rôle puis mourir soit par nécrose soit par apoptose.

## **II. Fonctions cellulaires des PN**

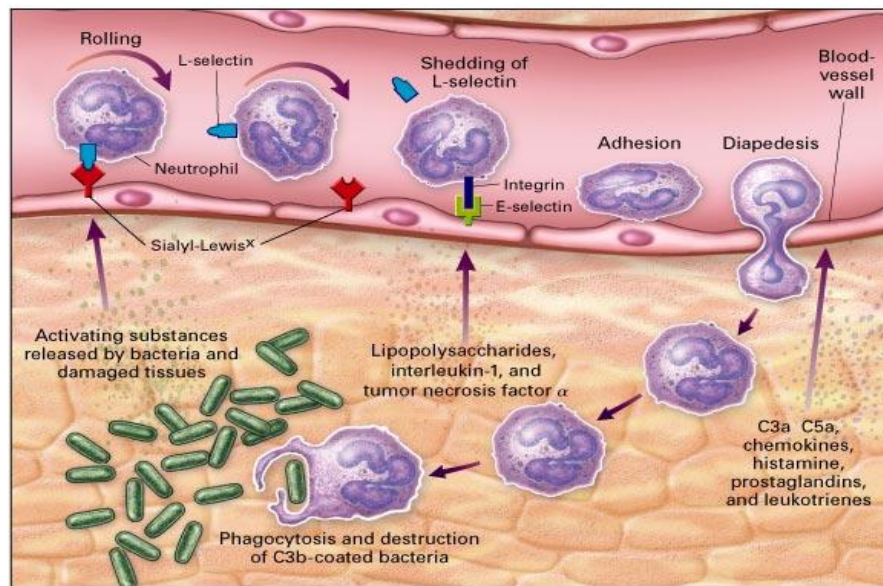
Les principales fonctions des polynucléaires neutrophiles se déclinent ainsi : le chimiotactisme permettant à la cellule de se rendre rapidement sur le site infectieux, la reconnaissance et la phagocytose de l'agent pathogène, la destruction de l'agent pathogène, la production de différents médiateurs régulant les réponses immunitaires.

### **1. Le chimiotactisme ou migration cellulaire dirigée**

Lors d'un processus infectieux, ou après une lésion tissulaire ou une inflammation, des médiateurs de l'inflammation sont produits par les cellules résidentes et vont modifier localement les propriétés adhésives et la perméabilité de l'endothélium. Les neutrophiles qui circulent dans le sang adhèrent à l'endothélium par des mécanismes de margination, ils s'accolent et roulent le long de la paroi du vaisseau sanguin grâce aux protéines d'adhérence (sélectines, intégrines et membres de la superfamille des immunoglobulines). Un perpétuel remodelage du cytosquelette d'actine avec la participation de la myosine, sont aussi des éléments majeurs générant les forces motrices de la chimiotaxie. Sous l'effet des facteurs chimiotactiques établis en gradient de concentration croissante vers le foyer infectieux, les neutrophiles s'insinuent entre les cellules endothéliales et traversent la paroi vasculaire (diapédèse ou extravasation), puis migrent dans les tissus (Figure 2). La migration dirigée des neutrophiles vers le site infectieux est donc un processus intégré de plusieurs étapes hautement complexes. Elle est guidée par des molécules appelées chimioattractants. Ces molécules libérées par les microorganismes invasifs ou générées de manière endogène par l'hôte, se fixent sur des récepteurs membranaires spécifiques, qui sont des RCPG (récepteurs couplés à la protéine G). Les principaux chimioattractants des PN sont les suivants :

- des dérivés des protéines bactériennes tels que les N-formyl-peptides et en particulier le N-formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine : fMLF. Le fMLF est un tripeptide formylé qui se lie à la surface des PN sur des récepteurs de faible ou forte affinité (FPR) (Prossnitz et al., 1997),
- des protéines dérivées du complément comme le C5a, après activation de la voie classique, de la voie alterne ou de la voie des lectines.
- des dérivés lipidiques tels que le leucotriène B4 (LTB4) et le « Platelet-Activating Factor » (PAF),

- des chimiokines dont le prototype pour les PN est l'IL-8.



**Figure 2.** *Migration du neutrophile vers le site inflammatoire (d'après chronicprostatitis.com)*

## 2. La reconnaissance et la phagocytose de l'agent pathogène

### a) Reconnaissance de l'agent pathogène

Arrivés au contact de l'agent pathogène, les polynucléaires neutrophiles reconnaissent leur cible grâce à des récepteurs de reconnaissance, les PRR (Pattern Recognition Receptors), qui se lient à des motifs moléculaires conservés au cours de l'évolution des microorganismes: les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Les PRRs sont présents à la surface des cellules phagocytaires, dans les endosomes et dans le cytosol. Parmi les PRR, les TLR (Toll-Like- Receptor) reconnaissent, selon leur type, plus particulièrement certains motifs. Par exemple, TLR4 reconnaît les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram négatif, TLR2 reconnaît les peptidoglycans des bactéries Gram positif, TLR7 et le TLR8 reconnaissent l'ARNsb viral. Dans le cas du TLR4, la "lipopolysaccharide (LPS) binding protein" qui se lie au LPS des bactéries Gram-négatif et au récepteur CD14 des cellules phagocytaires, joue le rôle d'une opsonine spécifique du type de microorganismes et est capable d'augmenter l'interaction hôte-pathogène. Ces récepteurs seront détaillés dans un chapitre séparé de ce manuscrit. Les CLR (C-type lectin receptors) sont des récepteurs membranaires

majoritairement exprimés à la surface des macrophages et des cellules dendritiques. Ils fonctionnent de façon calcium-dépendante et possèdent un ou plusieurs domaines de reconnaissance des carbohydrates appelés « carbohydrate-recognition domains » (CRD). Le domaine CRD a initialement été identifié dans la protéine circulante MBL (mannose binding lectin). Il lui permet de se fixer sur la paroi des pathogènes et de faciliter leur reconnaissance par les phagocytes. D'autres type de PRR à localisation cytoplasmique ; les NLR (Nucleotide binding oligomerization domain-like receptors) sont capables de reconnaître l'agent pathogène, par exemple le muramylpeptide (MDP), un composant de la paroi bactérienne reconnu par le récepteur NOD2. Les (RLH) (RIG-I-like helicases) sont une famille d'ARN hélicases cytoplasmiques contiennent les protéines « retinoic-acid-inducible protein 1 » (RIG-I ou Ddx58) et « melanoma-differentiation-associated gene 5 » (MDA-5, Ifih1 ou Helicard) qui reconnaissent des intermédiaires de réplication virale, les ARN double-brin (dsRNA) viraux.

La fixation du polynucléaire neutrophile à sa cible et sa phagocytose sont facilités par les opsonines, particulièrement les immunoglobulines d'isotype IgG1 et IgG3 et les protéines du complément dérivées de C3b et C3bi. Les immunoglobulines se fixent de façon spécifique sur les épitopes de l'agent pathogène par leur site anticorps Fab, et sur les récepteurs Fc $\gamma$  des polynucléaires neutrophiles par leur fragment Fc. Les polynucléaires neutrophiles expriment constitutivement deux récepteurs Fc $\gamma$  de faible affinité, CD32a (Fc $\gamma$  RIIa) et CD16b (Fc $\gamma$  IIIb), tandis que l'expression du récepteur de haute affinité CD64 (Fc $\gamma$  RI) est inducible par l'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) produit par d'autres cellules immunitaires. Différentes réponses des polynucléaires neutrophiles sont induites par l'engagement des récepteurs Fc $\gamma$  notamment la mobilisation de calcium intracellulaire, la phosphorylation de protéines, la production d'anions superoxyde et la dégranulation.

Les protéines provenant de l'activation du complément, notamment C3b et C3bi, se déposent à la surface de l'agent pathogène et se lient aux récepteurs CR1(CD35), CR3 (CD11b/CD18) et CR4 (CD11c/CD18) des polynucléaires neutrophiles permettant à la suite la phagocytose et l'élimination de l'agent pathogène (Pour revue : Verhoef et al., 1993).

## **b) Phagocytose de l'agent pathogène**

La reconnaissance et l'adhérence du PN à la cible sont le plus souvent suivies d'une phagocytose de la particule lorsque sa taille le permet. L'ingestion du pathogène se fait grâce à la formation du phagosome, vacuole contenant la particule ingérée. Un phagolysosome est

ensuite constitué lorsque les diverses granulations contenues dans le polynucléaire neutrophile ont fusionné avec le phagosome. La maturation de ce compartiment se caractérise par une acidification progressive et une accumulation de marqueurs et d'effecteurs bactéricides. Tous ces événements permettent une destruction optimale de l'agent pathogène dans l'espace protégé du phagolysosome (Flannagan et al., 2009).

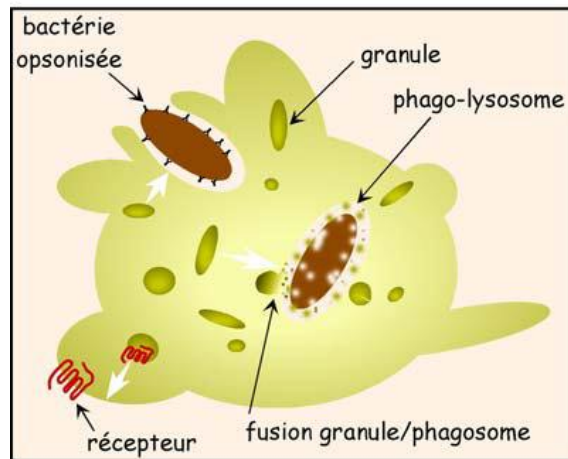
### **3. La destruction de l'agent pathogène**

L'englobement du micro-organisme en conjonction avec l'interaction au niveau membranaire de différentes molécules (N-formyl peptides dérivés des protéines bactériennes, endotoxines ou encore produits d'origine cellulaire tels que les cytokines) vont engager les PN dans leurs fonctions effectrices dont la destruction de l'agent pathogène est un événement critique dans la défense de l'hôte. Deux grands types de mécanismes interviennent de façon coopérative: d'une part des mécanismes de dégranulation indépendants de l'oxygène conduisant au déversement de substances bactéricides dans le phagosome et d'autre part la production de FRO par activation d'un système enzymatique, la NADPH oxydase. Ces événements sont intriqués comme le montrent les exemples suivants: le déversement de la MPO à partir des granulations azurophiles dans le phagosome intervient dans la transformation des FRO, la fusion des sous-unités du cytochrome b558 ancrées dans les membranes des granulations spécifiques avec celle du phagosome permet l'assemblage de la NADPH oxydase à ce niveau. Malgré la coopération de ces mécanismes, ils seront exposés séparément dans un but didactique.

#### **❖ Mécanisme indépendant de l'oxygène ; la dégranulation**

Les neutrophiles matures ne synthétisent que peu de protéines de novo. Ils possèdent au contraire des stocks de protéines qu'ils peuvent mobiliser très rapidement suivant les besoins. Comme décrit ci-dessus, ces protéines sont stockées dans des organelles de stockage intracellulaires (les granules) (Segal et al., 2005). Sous l'influence de divers stimuli, le PN engage un processus, appelé dégranulation (Figure 3), qui permet le déversement dans les vacuoles de phagocytose de nombreuses enzymes lysosomales, donnant ainsi naissance au phagolysosome. Les enzymes lysosomales interviennent dans la digestion des pathogènes phagocytés. Le lysozyme hydrolyse les glycosaminoglycanes de la paroi bactérienne et fongique. Un certain nombre de protéines cationiques déversées dans le phagosome y exercent une activité antibiotique. Les  $\alpha$ -défensines sont de petits peptides de 29 à 34 acides

aminés présents en très grande quantité dans les PN (ils représentent 30 à 50% du contenu protéique des granules azurophiles). Elles exercent une activité microbicide très large ; en effet, elles sont actives sur les bactéries Gram positif et Gram négatif, les champignons et même les virus en formant des canaux membranaires dans les bicouches lipidiques et en augmentant la perméabilité membranaire. Les défensines sont probablement un facteur primitif de défense retrouvé très tôt au cours de l'évolution animale (Lehrer et al., 1993). La «Bactericidal Permeability Increasing protein» (BPI), est présente dans les granulations azurophiles. Elle a une homologie avec les protéines décrites sous le nom de LBP (« LPS-Binding Protein ») et est très efficace contre les bactéries Gram- en altérant les propriétés des membranes bactériennes et en augmentant leur perméabilité, ce qui entraîne l'inhibition du métabolisme et de la respiration bactérienne. Les serprocidines sont des sérines protéases comme l'élastase, la protéinase 3, la cathepsine G ou l'azurocidine qui ont également une activité bactéricide (Levy et al., 1996; Ganz et al., 1995). Par ailleurs, le déversement de la myéloperoxydase illustre la coopération entre les mécanismes de dégranulation et la production des formes réactives de l'oxygène (FRO) par la NADPH oxydase comme nous le décrirons plus loin. La dégranulation permet aussi l'apport à la membrane d'un pool de récepteurs stockés dans les granulations permettant ainsi un recyclage ou une augmentation de l'expression de ces récepteurs à la surface membranaire ; c'est le cas pour le récepteur du fMLF ou le CD11b/CD18. Il a été suggéré que cette mobilisation de récepteurs a pour conséquence la potentialisation de la réception du signal. Le cytochrome b558 est contenu dans la cellule au repos à 90 % dans les membranes des granules spécifiques, des granules gélatinases et des vésicules de sécrétion (Tableau 1) et à 10 % dans la membrane plasmique. Après phagocytose de l'agent pathogène, la dégranulation va induire le transfert du cytochrome b558 du pool granulaire vers la membrane plasmique ou phagosomale permettant suite à son couplage aux composants cytosoliques de la NADPH oxydase, la production de l'anion superoxyde, source d'autres FRO.

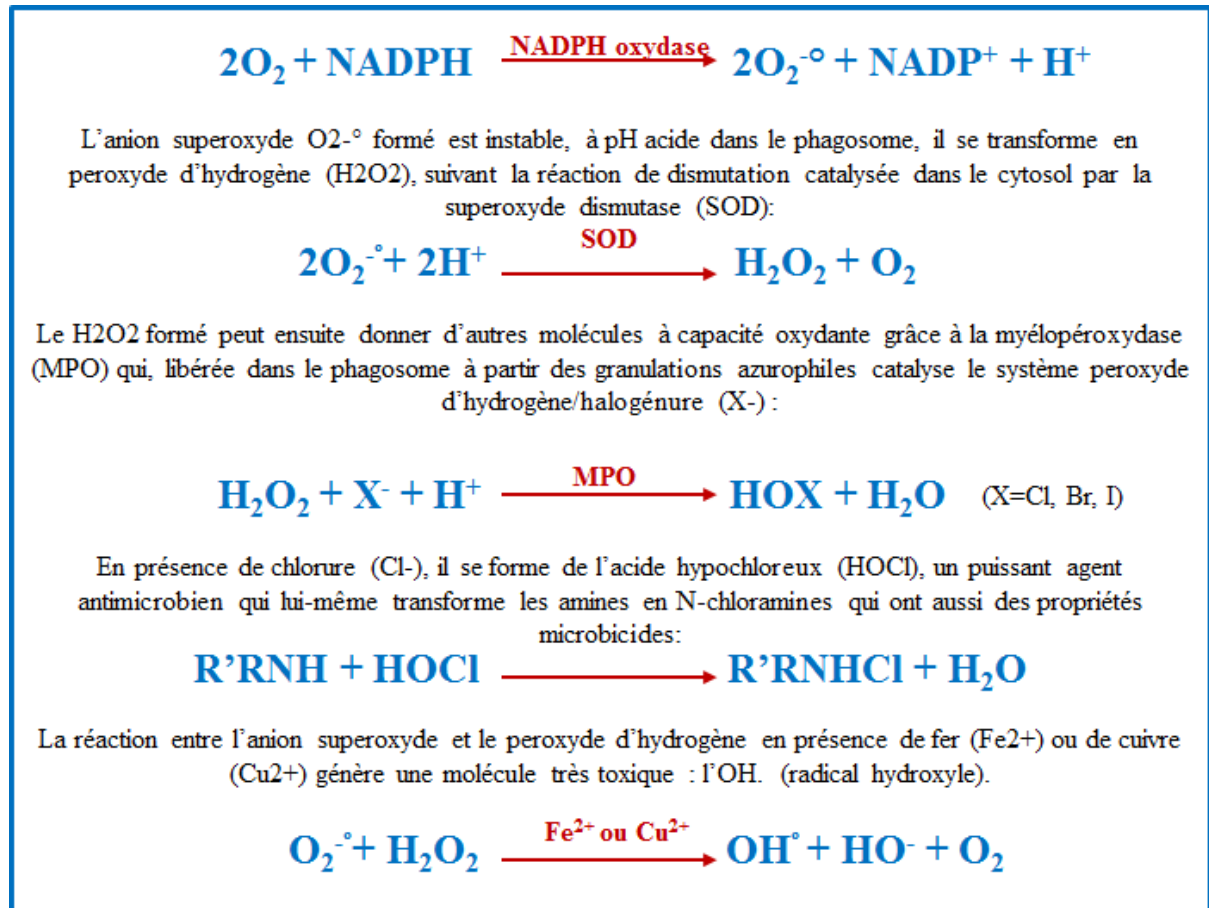


*Figure 3 : la dégranulation du neutrophil*

❖ **Mécanisme dépendant de l'oxygène ; l'explosion oxydative par la NADPH oxydase phagocytaire (NOX2)**

Sous l'influence de divers stimuli les PN produisent très rapidement des formes toxiques de l'oxygène altérant la structure des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Cette production rapide est appelée « explosion oxydative ». L'oxygène consommé par les PN est converti enzymatiquement en anion superoxyde ( $O_2^-$ ) par une réduction monovalente en utilisant le NADPH cellulaire provenant de la voie des hexoses monophosphates qui sert de donneur d'électrons; cette réaction est catalysée par la NADPH oxydase que nous décrirons en détail ultérieurement. Les anions superoxydes formés par le complexe multimérique de la NADPH oxydase, situé à la membrane cytoplasmique, sont libérés à la face externe de cette membrane. Ainsi, les ions peuvent agir à l'extérieur du PN et à l'intérieur du phagosome, la face externe de la membrane plasmique devenant la face interne du phagosome lors de l'invagination phagocytaire (Roos et al., 2003 ; Gougerot-Pocidalo et al., 2002). L'anion superoxyde est un précurseur de plusieurs autres formes de l'oxygène fortement réactives et plus toxiques pour le pathogène: le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ ) et l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). Le peroxyde d'hydrogène peut être transformé en acide hypochloreux ( $HOCl$ ), un composé bactéricide, par la myéloperoxydase libérée dans le phagosome (Figure 4). Le radical hydroxyle est hautement toxique réagissant avec les molécules de l'environnement à la vitesse de la diffusion moléculaire. Ces réactions forment aussi un composé très toxique l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), (Babior et al., 2000 ; Hampton et al., 1998; Wang et al., 1996). Si ces produits sont libérés de manière exagérée dans le milieu

extracellulaire, ils peuvent engendrer des dommages tissulaires dus à la peroxydation lipidique, causant une désorganisation membranaire, ou encore à l'altération de protéines et d'acides nucléiques (Gougerot-Pocidal et al., 2006)



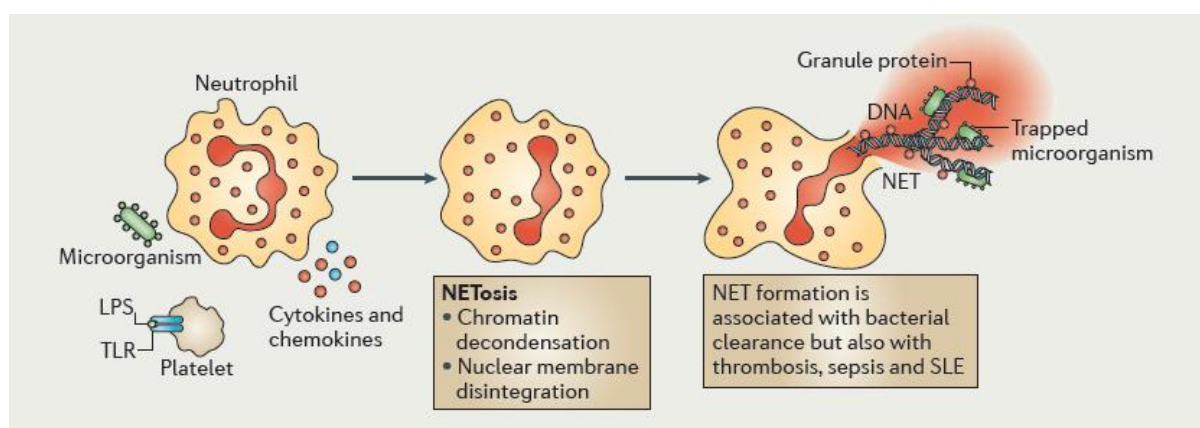
**Figure 4 : Les réactions de production des formes réactives de l'oxygène (FRO) par le PN**

#### ❖ Bactéricidie par les NET'S (Neutrophil Extracellular Traps)

En plus des mécanismes bactéricides décrits ci-dessous, les PN peuvent tuer les agents pathogènes en formant des filaments extracellulaires (NETs) composés de matériel nucléaire (ADN et histones) et de protéines issues des granules primaires (comme la myéloperoxydase et l'élastase), des granules secondaires (comme la lactoferrine et la pentraxine (PTX3)) (Jaillon et al, 2007) et des granules tertiaires (la matrix metalloproteinase 9 (MMP9) et les peptidoglycan recognition protein short (PGRP-S)) (Dziarski et al, 2003). L'ADN formant les NETs contient aussi de l'ADN mitochondrial (Yousefi et al., 2009). Il a été montré que les NETs piègent les microorganismes (comme *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhimurium*, *Candida albicans* et



*Leishmania amazonensis*) et permettent leur interaction avec les protéines bactéricides issues des granules, participant à leur destruction (Figure 5). Les molécules composants les NETs exercent diverses fonctions ; la reconnaissance des agents pathogènes (par exemple par les PGRP-S et les PTX3), la microbicidie (par les cathélicidines) et le remodelage tissulaire (par les élastases et les MMP9). La formation des NETs est rapide, elle s'effectue au bout de quelques minutes, après une désintégration de toutes les membranes cellulaires du PN sous l'influence de divers stimuli. C'est un processus actif médié par la production de FRO (Fuchs et al., 2007).



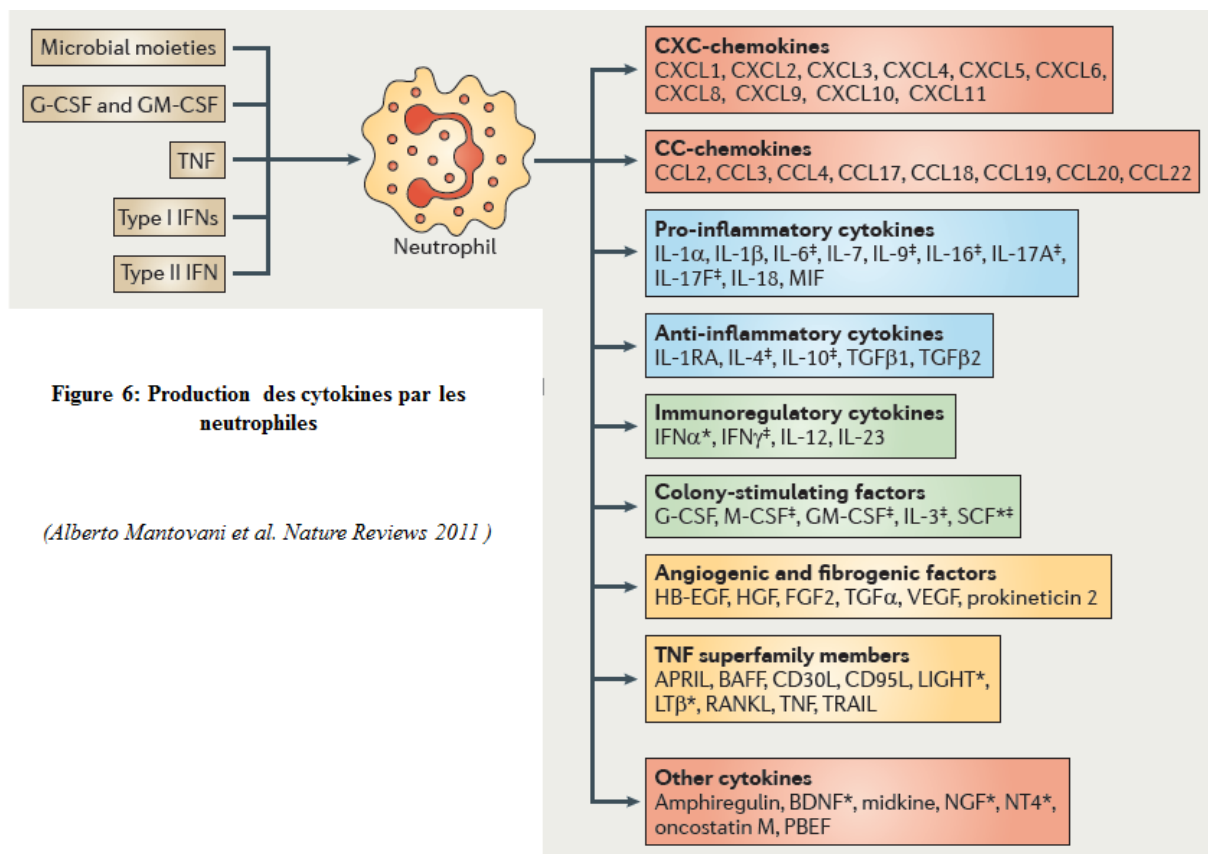
**Figure 5 : Bactéricidie par les NET'S (Neutrophil Extracellular Traps)**

(D'après Alberto Mantovani et al. *Nature Reviews* 2011)

#### **4. La production de médiateurs de l'inflammation par les neutrophiles**

Le PN participe à la régulation des réponses immunitaires en libérant un certain nombre de médiateurs : cytokines pro- et anti-inflammatoires, chimiokines, facteurs de croissance, médiateurs lipidiques (Cassatella et al., 1995). Les PN sont les premières cellules provenant du sang circulant vers le foyer inflammatoire et cette production précoce de médiateurs intervient dans l'engagement et la régulation des différentes réponses immunitaires innées et adaptatives (Arai et al., 1990). Les médiateurs lipidiques produits sont notamment le PAF et le LTB4 qui interviennent eux-mêmes dans l'induction des fonctions des PN. Les cytokines et chimiokines produites par les PN sont listées dans la Figure 6. Les PN ont la capacité de synthétiser et libérer des cytokines différentes selon le ou les stimuli utilisés. Ainsi, les PN en réponse au LPS libèrent des cytokines proinflammatoires comme l'interleukine-1 beta (IL-

1 $\beta$ ), le TNF $\alpha$  et l'IL-8, mais aussi le puissant inhibiteur de l'IL-1, l'IL-1ra (Yoshimura et al., 1997). Le LPS associé à l'IFN $\gamma$  induit la production d'IL-12 par les PN. L'IL-4 augmente la production de l'IL-1ra et inhibe la production d'IL-1 $\beta$  induites par le LPS (Malyak et al., 1994). Une production différentielle de multiple isoformes d'IL-1ra en réponse à la stimulation des PN par le LPS est notée. Ainsi, la même équipe en 1998 a montré que des PN stimulés par le LPS peuvent produire l'isoforme sIL-1ra (sécrétoire), celui-ci joue un rôle important dans la régulation des effets de l'IL-1 dans le milieu extracellulaire (Malyak et al., 1998). Les PN sont de puissants producteurs de chimiokines telles que l'IL-8 et le GRO $\alpha$ , appartenant à la famille des C-X-C chimiokines, les MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$ , appartenant à la famille des C-C chimiokines.



**Figure 6: Production des cytokines par les neutrophiles**

(Alberto Mantovani et al. Nature Reviews 2011)

### **III. Résolution de l'inflammation et apoptose des PN**

Une fois l'agent agresseur éliminé, la réponse inflammatoire s'autolimité, et démarre en même temps le processus de réparation tissulaire. Cette phase de résolution est fondamentale pour la protection des tissus, l'établissement d'une mémoire immunitaire adéquate ainsi que pour le retour à un état d'homéostasie. Pour les PN ceci implique la diminution de leur accumulation dans le site inflammatoire, la suppression de leur activation, la production de protéines anti inflammatoires, l'induction de leur apoptose et leur élimination par les macrophages (Kennedy et al., 2009). Les principaux facteurs déterminant l'arrêt de la migration et de l'activation des PN au niveau du site inflammatoire sont : 1) Le changement du profil d'expression des cytokines et de leurs antagonistes (IL-1/IL-1Ra, TNF/TNF-R soluble) ainsi que de la balance entre cytokines pro- et anti-inflammatoires (IL-10, IL-4 et IL-13) secrétées par les cellules du foyer inflammatoire (macrophages, neutrophiles et cellules endothéliales) (Nathan et al., 2006). La dégradation des facteurs chimioattractants et les phénomènes de désensibilisation des PN vis-à-vis des chimiokines jouent également un rôle important ; 2) les dérivés lipidiques comme les lipoxines, les résolvines et les protectines, considérés comme des vrais agonistes de la résolution de l'inflammation (Serhan et al., 2010) ; 3) les molécules qui régulent l'apoptose du PN. Comme déjà mentionné, les PN ont une demi-vie courte mourant spontanément par apoptose en quelques heures. Cette demi-vie courte pourrait être interprétée comme un mécanisme de contrôle strict du renouvellement et du nombre de PN dans l'organisme. Une dérégulation de l'entrée en apoptose peut induire différents phénomènes. pathologiques : une mort accélérée du PN peut participer à différentes causes de neutropénie favorisant le risque infectieux alors qu'un retard de l'entrée en apoptose peut participer à la physiopathologie de différentes maladies inflammatoires et auto-immunes. On distingue une apoptose spontanée constitutive du PN (Luo et al., 2008) et une apoptose induite par la phagocytose (Gilroy et al., 2004) qui sont régulées par l'environnement notamment cytokinique. Finalement, les PN apoptotiques sont reconnus et phagocytés par les macrophages résidents (Erwig et al., 2007). La phagocytose des PN apoptotiques fait basculer les macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire favorisant encore la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire (Ravichandran et al., 2007). Une agression extrême des PN peut conduire à une nécrose dite primaire avec une perte rapide et irréparable de l'intégrité de la membrane plasmique conduisant à la libération dans l'environnement des composants toxiques du PN induisant des lésions tissulaires.

## **IV. Rôle des neutrophiles dans les pathologies**

Les neutrophiles jouant un rôle majeur dans l'immunité innée et régulant l'immunité adaptative, il n'est pas surprenant qu'ils soient impliqués dans plusieurs pathologies telles que ; les maladies infectieuses, les maladies inflammatoires chroniques, les maladies auto-immunes.

L'inflammation est l'ensemble des mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères. La réaction inflammatoire dépasse parfois ses objectifs, responsable d'effets délétères et peut être potentiellement dangereuse.

### **1. Les maladies inflammatoires**

La polyarthrite rhumatoïde (PR) par exemple, est une maladie systémique inflammatoire dont les manifestations cliniques s'expriment le plus souvent au niveau articulaire. Une dérégulation de la réponse immunitaire conduit au développement d'une synovite inflammatoire (Boissier et al., 2010). Les neutrophiles ne sont pas des cellules résidentes normales de l'articulation. L'augmentation anormale de leur nombre dans le liquide synovial des sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde, serait due à un exsudat, lui-même favorisé par la production locale de facteurs chimiotactiques (comme l'IL8), de produits de l'activation du complément (le C5a) et de l'activation cellulaire locale. Ces produits sont associés à des cytokines telles que TNF $\alpha$  qui induisent un « priming » de la NADPH oxydase permettant son hyperactivation en réponse à d'autres stimuli tels que les LTB<sub>4</sub>, ou des formyl peptides. Cette hyperactivation induit une hyperproduction de FRO en partie responsable des dommages articulaires (El-Benna et al., 2008) D'autres médiateurs de l'inflammation, dont les métabolites de l'acide arachidonique, renforceraient les phénomènes inflammatoires (Edwards et al., 1997).

Les PN circulants ne sont, normalement, pas activés et il est classiquement admis, qu'au cours des vascularites, une infection va déclencher cette « pré-activation ». En effet, les PN peuvent être préactivés par des cytokines inflammatoires comme le TNF-alpha. Ils sont caractérisés par une expression accrue de molécules d'adhérence, par une sensibilité accrue à activer leur NADPH oxydase pour générer des FRO. Dans ces conditions, ils expriment des

protéines granulaires à leur surface, en particulier les cibles des ANCA comme la myéloperoxydase ou la protéinase 3. Cette expression membranaire est essentielle pour que les ANCA anti-MPO ou anti-PR3 se lient à leurs antigènes et activent les PN. Ces derniers vont alors libérer leurs médiateurs délétères pour l'endothélium comme les oxydants et les protéases, à l'origine des lésions vasculaires (Witko-Sarsat et al., 1999). En contrepartie les NETs sont produites par les neutrophiles stimulés par les ANCA et ont été observés dans les glomérules et l'interstitium rénal chez des patients atteints de ces vascularites (Krumbholz et al., 2009). De plus, la protéinase 3 et la myéloperoxydase sont des composants des NETs, exposant ces auto-antigènes et entretenant la réponse autoimmune.

## **2. Les Déficits immunitaires**

Les déficits moléculaires induisant une perte fonctionnelle des PN se traduisent par la survenue d'infections bactérienne à multiplication extracellulaire grave et/ou répétées ainsi que par une susceptibilité accrue aux infections fongiques. Elles sont généralement localisées au niveau des surfaces normalement colonisées par des agents pathogènes : peau, poumon, tractus gastro-intestinal. L'identification des déficits touchant les fonctions indispensables à la destruction de l'agent pathogène par les PN (déficits de l'adhérence et du mouvement, déficits dans la reconnaissance des agents pathogènes, anomalies des granulations, déficits des sous unités de la NADPH oxydase...) a permis la connaissance du rôle de différentes molécules clés dans les fonctions microbicides des PN. Nous en donnerons ici quelques exemples.

Les déficits en molécules d'adhérence des PN ont permis de montrer leur rôle critique dans la défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Le LAD I pour « Leukocyte Adhesion Deficiency I » est dû à une absence de synthèse ou une synthèse anormale de la sous-unité CD18 des  $\beta 2$  intégrines, CD11a/CD18, CD11b/CD18 et CD11c/CD18 interviennent dans différentes fonctions du PN (adhérence à l'endothélium et à la cible, la migration). Ce déficit induit un retard de la chute du cordon, une hyperleucocytose à PN, une omphalite et des infections multiples, pouvant mettre en jeu le pronostic vital en l'absence de traitement approprié. Le LAD II pour « Leukocyte Adhesion Deficiency II » est dû à une altération d'origine génétique du métabolisme du fucose entraînant un défaut d'expression des sucres fucosylés tel le sialyl Lewis<sup>x</sup>, dont le rôle a été précédemment décrit dans l'adhérence entre PN et cellules endothéliales via les sélectines. Ces sucres interviennent notamment dans

le roulement des PN à la surface de l'endothélium. Ce déficit s'accompagne comme dans le LAD I d'une neutrophilie persistante, d'une anomalie de formation du pus et d'infections récurrentes notamment cutanées, pulmonaires, périodontales, et sont, de plus, associées à un retard staturopondéral et psychomoteur.

D'autres types de déficits touchant les fonctions des PN ont été bien étudiés, notamment les déficits dans la reconnaissance des agents pathogènes. Des polymorphismes des gènes codants pour les récepteurs 'Toll like' (TLR) : gènes codant pour le TLR2 ou le TLR4 ont été décrits, conduisant à une augmentation de susceptibilité aux infections à bactéries Gram+ ou Gram- (Agnese et al., 2002 et Ogus et al., 2004). Un déficit de la transduction de signal par la voie commune des TLR comme le déficit en IRAK4 (Picard et al., 2003) conduit également à des infections à pyogène à répétition. Le déficit en CD16b (FcγRIII récepteur pour le fragment Fc des IgG à la surface des PN) ainsi que le déficit en β2 intégrines interviennent également à ce niveau.

Les déficits portant sur les granulations des PN sont complexes et peuvent s'inscrire dans un tableau clinique polymorphe. Un déficit très rare, le déficit en granulations spécifiques des PN illustre l'importance de ces granulations dans la physiologie du PN. De transmission autosomale récessive, il se manifeste par des infections sévères superficielles et profondes. Des infections des voies respiratoires et cutanées sont fréquemment observées chez ces patients, en particulier à *Staphylococcus aureus*, à entérobactéries Gram négatif, à *Pseudomonas aeruginosa* ou à *Candida albicans*. Il est associé à une mutation dans un facteur de transcription (C/EBPε) impliqué dans la maturation des granulations spécifiques au cours de la granulopoïèse et responsable d'un déficit de nombreuses protéines granulaires impliquées dans la bactéricidie. Le diagnostic est cytologique avec un cytoplasme des PN « vide » après coloration habituelle au May Grünwald Giemsa et un noyau type « Pelger », bilobé. Il peut être confirmé par l'absence de protéines présentes dans les granulations spécifiques comme la lactoferrine ou la gélatinase. Sur le plan fonctionnel, un déficit du mouvement, de la production des FRO et de la bactéricidie reflète l'importance du contenu de ces granulations.

La granulomatose septique chronique (CGD, *Chronic Granulomatous Disease*) est un déficit immunitaire primitif des phagocytes et particulièrement des PN du à un défaut de production des FRO par la NADPH oxydase phagocytaire qui sera décrite plus loin. Les

cellules phagocytaires des malades phagocytent normalement les micro-organismes mais ne les détruisent pas, car elles sont incapables de produire correctement, en réponse à une stimulation, les anions superoxyde et les FRO qui en dérivent. Des mutations dans les gènes codant pour 5 différentes sous-unités du complexe NADPH oxydase aboutissent à une absence d'activité de la NADPH oxydase ou, moins souvent, à un très faible niveau de son activité. Il s'agit d'une maladie rare d'origine génétique touchant environ 1/200 000 naissances. C'est le déficit fonctionnel des PN, s'accompagnant de symptômes cliniques évoquant un déficit immunitaire le plus fréquent. Les déficits portant sur les différentes sous-unités de la NADPH oxydase ont permis de progresser dans de nombreux aspects fonctionnels de ce complexe enzymatique jouant un rôle majeur dans la microbicide du PN.

Toutes ces données physiopathologiques, montrent la complexité de fonctionnement des PN qui nécessitent des études encore plus poussées pour mieux comprendre leur fonctionnement et leur niveau de contribution dans les pathologie humaines.

## **B. LES RECEPTEURS TOLL-LIKE (TLR)**

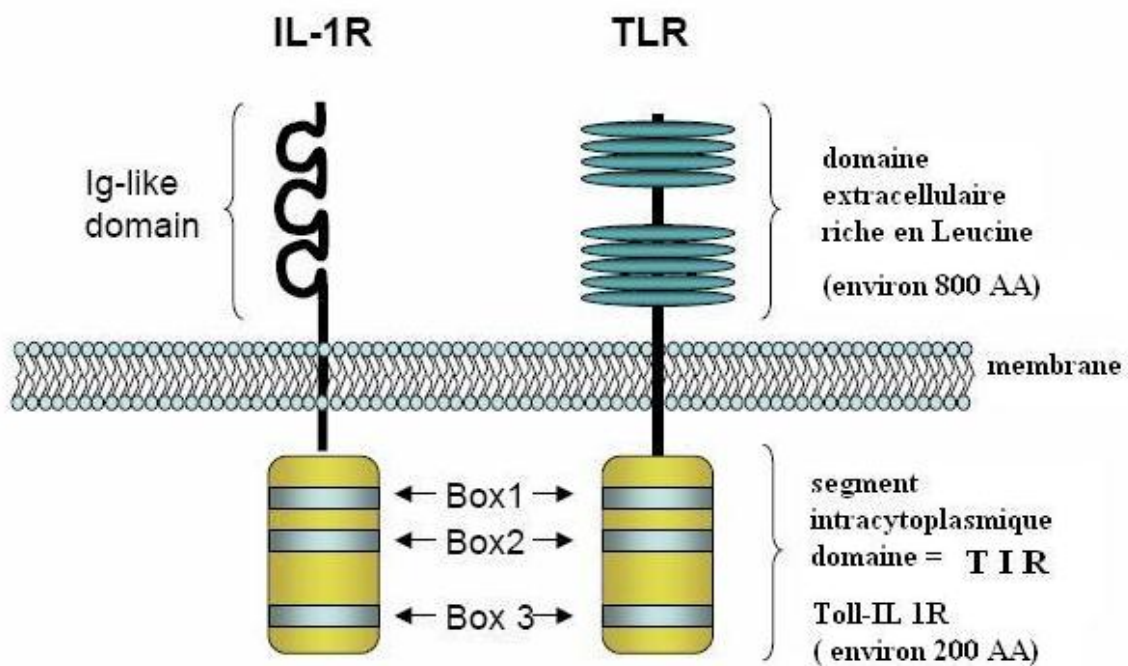
### **I. Phylogénie des TLRs**

*Toll* a initialement été identifié comme un gène important lors de l'embryogenèse, et en particulier, lors de la mise en place de l'axe dorso-ventral de la drosophile (Stein et al., 1991). Puis il a été montré que Toll joue un rôle crucial dans la reconnaissance des agents pathogènes (Lemaitre et al., 1996). En réponse à l'infection (par des bactéries à Gram positif ou des champignons), la drosophile se manifeste contre l'agent pathogène par la synthèse d'un cocktail de peptides antimicrobiens. L'étude génétique de l'expression des gènes codant pour ces peptides a mené à l'identification de la voie Toll. Cette voie qui est activée en réponse à ces infections, contrôle notamment l'expression d'un peptide antifongique, la drosomycine (Hoffmann et al., 2003). Une année après la découverte de Toll chez la drosophile, une protéine homologue a été identifiée chez les mammifères (Medzhitov et al., 1997). A l'heure actuelle 11 TLR ont été identifiés chez l'homme et 13 chez la souris (Akira et al., 2004). Ces récepteurs font partie des PRR (Pattern-Recognition Receptors) les mieux étudiés et les plus conservés au cours de l'évolution, des plantes aux mammifères, en passant par les nématodes, les poissons et les insectes.

## II. Structure des TLRs (figure 6)

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires de type I. Ils sont composés de trois domaines

- Un domaine N-terminal extracellulaire, qui permet la reconnaissance du ligand,
- Un domaine transmembranaire,
- Un domaine C-terminal intracellulaire qui permet la transduction du signal.



*Figure 6 : Structure des TLR*

### 1. Domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire des TLR est composé d'environ 800 acides aminés, sous forme de répétitions riches en leucines appelées Leucin-Rich Repeats ou LRR. Ce domaine extracellulaire est impliqué dans la reconnaissance de l'agent pathogène et joue un rôle clé



dans l'initiation de signalisation des TLRs (Akira et al., 2003). La répartition et le nombre de motifs répétés riches en leucine est propre à chacun des TLRs ce qui leur confère leur spécificité dans la reconnaissance des pathogènes (Bell et al., 2003 ; Choe et al., 2005).

## **2. Domaine intracellulaire ou domaine TIR**

Le domaine intracellulaire TIR composé de 150 à 200 aa, est similaire à celui du récepteur de l'IL-1, est appelé domaine TIR (Toll/IL-1R/R) (Imler et al., 2001). Trois séquences très conservées appelées box 1, box 2 et box 3 ont été caractérisées dans ce domaine TIR après alignement de séquences des différents membres de la famille IL-1R/TLR (Luo et al, 2000). Ces séquences sont impliquées dans la transduction du signal en aval du récepteur. La séquence box 1 est impliquée dans le couplage du TLR avec un autre récepteur (Xu et al, 2000), la séquence box 2 est quant à elle impliquée dans l'interaction avec les molécules adaptatrices qui interviennent dans la signalisation des TLRs (Xu et al., 2000). La séquence box 3 contient des acides aminés essentiels pour la signalisation et est impliquée dans la localisation du récepteur par des interactions avec des éléments du cytosquelette (Slack et al, 2000) et aussi dans l'interaction avec les domaines TIR des molécules adaptatrices (Xu et al., 2000).

## **III. Expression des TLRs**

### **1. Localisation cellulaire**

La localisation des TLRs est variable selon les ligands qu'ils reconnaissent et la cellule dans laquelle ils sont exprimés. Ainsi, les TLRs qui sont activés par les PAMPs bactériens et fongiques (TLR1, 2, 4, 5 et 6) sont exprimés à la surface cellulaire (Hopkins et al., 2005 ; Takeda et al., 2003) mais aussi ils sont exprimés dans l'appareil de Golgi formant une réserve de TLR. Les TLRs qui reconnaissent des acides nucléiques (TLR3, 7, 8, 9) sont exprimés dans les vésicules endosomales (Hopkins et al, 2005). Mise à part le TLR3 dont sa localisation cellulaire dépend de la cellule dans laquelle il est exprimé. En effet, dans des lignées cellulaires fibroblastiques humaines, le TLR3 est exprimé à la surface cellulaire alors qu'il est exprimé au niveau des vésicules endosomales dans les cellules dendritiques humaines d'origine myéloïde (Matsumoto et al., 2003). La localisation des TLR varie selon la

localisation d'une région bien spécifique qui est exprimée dans des endroits différents des récepteurs Toll. Par exemple la localisation du TLR3 dépendrait d'une région cytoplasmique appelée "région linker" située dans la séquence box 3 du domaine TIR (Nishiya et al., 2005). Tandis que la région responsable de la localisation du TLR7 se trouve dans le domaine transmembranaire (Nishiya et al., 2005). Ainsi, en raison de la forte homologie de cette région entre TLR7, 8, et 9, il a été suggéré que TLR8 et TLR9 sont également localisés au niveau des endosomes (Takeda et al., 2003). Ces régions ne sont pas conservées entre les différents TLR ce qui explique leur diversité de localisation.

## **2. Expression cellulaire**

Les TLR sont exprimés majoritairement dans les cellules immunitaires et surtout dans les PN les monocytes et les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B (Janeway et al., 2002) dont ils participent en grande partie dans la reconnaissance de l'agent pathogène.

Les TLR sont aussi exprimés dans d'autres cellules et autres tissus incluant les cellules endothéliales. L'expression des différents TLR varie de façon importante en fonction du type et du niveau d'activation cellulaire. Ainsi, les monocytes et les macrophages expriment tous les TLRs sauf TLR3 de même pour les PN, alors que dans le cas des cellules dendritiques, l'expression de ces récepteurs dépend de la souspopulation des cellules dendritiques (Hopkins et al., 2005 ; Takeda et al., 2003 ; Zarembek et al., 2002).

## **IV. La reconnaissance des agents pathogène par les TLR et leur activation**

Les TLRs sont des récepteurs de l'immunité innée, appartenant à la famille des PRR qui interviennent au cours des mécanismes de l'immunité innée en reconnaissant des motifs moléculaires conservés chez les pathogènes, appelés PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns). L'engagement de ces récepteurs active dans les cellules qui les expriment (lymphocytes (LT et LB), cellules dendritiques (DCs), cellules Natural killer (NK), macrophages, polynucléaires neutrophiles (PN), fibroblastes, cellules épithéliales, cellules

endothéliales...) plusieurs cascades de signalisation qui aboutissent à la mise en place des effecteurs de l'immunité innée. En plus de fournir une première ligne de défense contre les pathogènes, l'immunité innée joue un rôle instructif vis à vis de l'immunité acquise. Il a en outre été montré que ces récepteurs sont capables d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines. Celles-ci permettent l'attraction et l'activation de plusieurs cellules immunitaires comme les monocytes, LT, NK, PN. Les TLR induisent la synthèse de molécules de co-stimulation (CD80, CD86...), permettant la maturation des lymphocytes T (Iwasaki et al., 2004), et pourraient également jouer un rôle clé dans l'activation des voies de signalisation pro-ou anti-apoptotiques, notamment TLR2 et/ou TLR4.

La génération de souris "knock-out" pour chacun des gènes codant pour les différents TLR a, permis la caractérisation des ligands de chacun de ces PRRs.

L'activation des TLRs est différente selon leur localisation subcellulaire et les ligands qu'ils peuvent reconnaître. Ces récepteurs qui sont exprimés soit à la surface de la cellule (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6) soit dans les endosomes (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) peuvent être activés par différents PAMPs bactériens, fongiques, parasitaires, viraux et endogènes. Les PAMPs sont sous forme de protéines (telle que la flagelline et les porines des bactéries), de lipides (telle que le LPS et le LTA des bactéries aussi), de sucres (telle que le zymosan fongique), des acides nucléiques (telle que le CpG DNA des bactéries et des virus et l'ARN viral simple ou double brin) (Akira et al., 2006) (Tableau 3). Des agonistes endogènes DAMP (danger-associated molecular pattern) peuvent aussi être reconnus par les TLR et permettent leur activation (Matzinger et al., 1994).

Selon leur association avec des corécepteurs variés (TLR ou autres récepteurs), les TLRs peuvent activer différentes voies de signalisations qui conduisent à des réponses transcriptionnelles différentes et donc à des fonctions différentes (Akira et al., 2006). Le TLR2 a la particularité de s'associer en hétérodimère avec TLR1 ou TLR6, chaque hétérodimère présentant une spécificité de ligand différente. Les TLR peuvent aussi dépendre d'autres co-récepteurs pour la sensibilité totale au ligand, comme dans le cas de la par le TLR4 qui requiert la protéine MD2. Le CD14 et les protéines liant le LPS (LBP pour LPS Binding Protein) sont par ailleurs connus pour faciliter la présentation du LPS par MD2.

Récepteur	Ligands	Origine du ligand	Références
TLR2	Peptidoglycane Acides lipotéichoïques (LTA) Lipopeptides/lipoprotéines Lipoarabinomannane Zymosan Porines	Bactéries à Gram positif  Bactérie Mycobactérie Paroi des levures Membrane externe des <i>Neisseria</i>	Yoshimura, 1999  Takeuchi, 2001 Means, 1999 Underhill, 1999 Massari, 2002
TLR2/1	Lipopeptides triacylés (Pam3CSK4) Lipoprotéines OspA	Membrane externe de <i>Borrelia burgdorferi</i>	Takeuchi, 2002 Alexopoulou, 2002
TLR2/6	MALP-2 Lipopeptides diacylés	Mycobactérie	Takeuchi, 2001
TLR3	ARNdd	Virus a ARN	Alexopoulou, 2001
TLR4	LPS Complexe LPS-LBP Protéine F virale Bêta rétrovirus  HSP60 Flavolipin	Bactéries Gram-négative  Virus syncytial respiratoire Tumeur mammaire de la souris de type B 66 <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Flavobacterium meningosepticum</i>	Ulevitch, 1999 Kurt-Jones, 2000 Rassa, 2002  Costa, 2002 Gomi, 2002
TLR5	Flagelline	Bactéries	Hayashi, 2001
TLR7	Imidazoquinolines (Resiquimod et imiquimod) Loxoribine Bropirimine ARNss	Composant synthétique  Composant synthétique Composant synthétique Virus	Hemmi, 2002  Akira, 2003 Diebold, 2004
TLR8	Imidazoquinolines (Resiquimod) ARNss	Composant synthétique Virus	Hemmi, 2002 Diebold, 2004
TLR9	CpG ADN	Bactéries et Virus	Medzhitov, 1998
TLR11	profiline-like	<i>Toxoplasma gondii</i>	Yarovinsky, 2005

**Tableau 3. Les TLR et leurs ligands.**

## **1. TLR2, TLR1/TLR2 et TLR6/TLR2**

TLR1, 2, 6 sont des médiateurs de la réponse inflammatoire lors d'une infection par des bactéries Gram-positif. Ils permettent la reconnaissance de nombreux composants microbiens et synthétiques. Le panel d'interactions possibles de TLR2 avec divers corécepteurs lui permet d'élargir son répertoire de ligands et de pouvoir diversifier son rôle dans la modulation de la réponse immunitaire innée. Ainsi il peut former des hétéro-dimères avec le TLR1, le TLR6, ou interagir avec CD14, CD36 (corécepteur avec TLR2/6) et la dectine-1. Les hétérodimères TLR2/1 et TLR2/6 reconnaissent respectivement des triacyl lipopeptides comme Pam3CSK4, des diacyl lipopeptides comme MALP-2 (Mycoplasma-derived macrophage activating-lipopeptide 2). Dans le complexe TLR2-TLR1-ligand, deux chaînes lipidiques du triacyl lipopeptides, interagissent avec le TLR2 alors que la troisième chaîne se lie au canal hydrophobe du TLR1 permettant une meilleure reconnaissance de ce ligand. Néanmoins, l'absence de ce canal hydrophobe dans le TLR6 empêche l'hétérodimère TLR2/6 d'interagir avec le triacyl lipopeptide. En conséquence cette différence de liaison des lipopeptides aux TLR1 et TLR6, est responsable de la discrimination entre les lipoprotéines (Jin et al., 2007 et Kang et al., 2009). TLR2, en association avec la Dectin-1 (recepteur de polysaccharides), se lie au zymosan. La liaison d'un ligand à TLR2 induit la production des cytokines inflammatoires par les macrophages et les cellules dendritiques. La production de l'interféron de type I par les monocytes activés, quant à elle, est induite par vaccinia virus ce qui suggère la spécificité cellulaire du rôle de TLR2 dans la réponse antivirale (Taille et al., 2009). La liaison d'un ligand à TLR2 induit l'activation de TIRAP ainsi que la voie MyD88-dépendante. TLR2 est également capable d'activer ERK, AP-1 (Dillon et al, 2004) et la voie PI3K/Akt (Akira et al., 2004), contribuant à l'initiation d'une réponse inflammatoire Th2 (production d'IL-10)

## **2. TLR3**

TLR3 reconnaît les acides ribonucléiques doubles brins (ARNdb). Il a été également rapporté que TLR3 peut être activé par les ARNm endogènes (Kariko et al., 2004). Chez l'homme, TLR3 est exprimé dans les cellules dendritiques myéloïdes mais pas dans les neutrophiles. Chez la souris, il est également exprimé dans les monocytes et les fibroblastes (Alexopoulou et al., 2001 ; Applequist et al., 2002 ; Heinz et al., 2003). Il est le seul TLR spécifique des acides nucléiques exprimé sur les cellules musculaires lisses vasculaires chez la souris et chez l'homme (Tsuboi et al., 2002). En réponse aux ARNdb, les cellules

dendritiques produisent des cytokines spécifiques comme l'IL-12 qui induit l'activation des cellules T vers un phénotype Th1 (Alexopoulou et al., 2001) ; l'interféron (INF) de type 1, qui est un médiateur puissant de l'immunité antivirale (Matsumoto et al., 2004). Ce qui suggère que le TLR3 a un rôle crucial dans la prévention des infections virales. En effet le déficit humain en TLR3, est associée à une forte susceptibilité aux herpes virus simplex type 1 (HSV-1) (Zhang et al., 2007).

### **3. TLR4**

TLR4 est le récepteur du LPS des bactéries Gram-négatif. IL peut s'associer à des protéines auxiliaires pour permettre une reconnaissance et une signalisation optimales. Ainsi, son association avec la protéine sécrétée MD-2 et le corécepteur CD14 permet de reconnaître le complexe formé par le LPS et la protéine circulante LBP (LPS-binding protein) (Ulevitch et al., 1999). L'activation de ce récepteur conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Chen et al., 2005). La stimulation par le LPS des cellules exprimant TLR4 active deux voies de signalisation : une voie dépendante de MyD88 (induisant la sécrétion de cytokines comme l'IL-6, l'IL-12 ou le TNF $\alpha$ ) ou une voie indépendante de MyD88 et dépendante de TRIF (induisant la sécrétion d'INF de type I) (Akira et al., 2004).

### **4. TLR5**

TLR5 a été identifié comme récepteur de la flagelline, un constituant du flagelle bactérien, et l'activation de la signalisation par TLR-5 entraîne la production de TNF $\alpha$  (Hayashi et al., 2001). La liaison de la flagelline à TLR5 induit l'activation de la voie dépendante de MyD88. Il a également été suggéré que TLR5 pouvait jouer un rôle dans les infections du tractus urinaire (UTI) (Andersen-Nissen et Al., 2007). Ce récepteur est fortement exprimé dans les cellules dendritiques CD11c+CD11b+ de la lamina propria de l'intestin grêle (Uematsu et al., 2008) qui sont les cellules uniques permettant la différenciation des cellules T helper (T<sub>H</sub>17) productrices d'IL17 et T helper de type 1 ainsi que la différenciation des lymphocytes B en cellules productrices d'IgA en réponse au flagelline (Uematsu et al., 2008). En outre les CD de la lamina propria sont capables de produire l'acide rétinoïque qui facilite leurs réponses humorale et innée.

## **5. TLR7 et TLR8**

TLR7 et TLR8 à localisation endosomale, sont impliqués dans la réponse à l'ARN simple brin d'origine virale (Diebold et al., 2004 ; Heil et al., 2004). Le TLR7 et le TLR8 reconnaissent les virus à ARN simple-brin comme l'influenza (Diebold et al., 2004 ; Lund et al., 2004), le virus Coxsackie B (Triantafyllou et al., 2005) et le virus de Sendai (Melchjorsen et al., 2005). Ainsi que certaines séquences d'ARN endogènes impliqués dans certaines maladies auto-immunes (Vollmer et al., 2005 ; Lau et al., 2005). De plus, TLR7 et TLR8 sont également impliqués dans la réponse à des composants synthétiques de la famille des imidazoquinolines (Hemmi et al., 2002) comme l'imiquimod (R837) et le resiquimod (R-848). Les TLR7 sont capables de reconnaître l'imiquimod et le resiquimod par contre, le TLR8 n'est activé que par le resiquimod R848 (Jurk et al., 2002). La stimulation de TLR7 et de TLR8 par les ARNs viraux active les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B et favorise la production d'interféron de type I, d'IL-12 et de TNF $\alpha$ . (Hemmi et al., 2002 ; Heil et al., 2004). Cette réponse cytokinique spécifique après exposition aux ligands de TLR7 stimule l'immunité antivirale. L'usage de l'imiquimod agoniste du TLR7 est actuellement approuvé dans le traitement des verrues génitales et périanales externes, dues à une infection au papillomavirus, chez l'adulte (von Krogh et al., 2001). D'autres études ont également suggéré que l'imiquimod était efficace dans le traitement de molluscum contagiosum (Liota et al., 2000), de kératoses actiniques (Salashe et al., 2002 ; Stockfleth et al., 2002) ou encore de carcinomes baso-cellulaires (Geisse et al., 2002 ; Schumack et al., 2002). L'efficacité de cette molécule est en cours d'évaluation dans d'autres infections virales cutanées et d'autre maladie inflammatoire comme la polyarthrite rhumatoïde. Par ailleurs, les analogues de guanosine comme la loxoribine (7-allyl-8-oxoguanosine) et la bropirimine (2-amin-5-bromo-6-phenyl-4(3)-pyrimidinone) sont également capables d'activer TLR7. Ils peuvent tous deux conduire à la production d'IFN $\alpha$  ou de cytokines (Akira, 2003). La voie activée par TLR7/8 est la voie dépendante de MyD88.

## **6. TLR9**

TLR9 reconnaît l'ADN bactérien contenant des motifs CpG (deoxyribo-cytidine-phosphate-guanosine) non méthylés (Hemmi et al., 2000 ; Medzhitov et al., 1998) et des oligonucléotides synthétiques contenant des dinucléotides CpG non méthylés. De plus, il a récemment été mis en évidence que des virus à ADN, tels que les virus de l'herpès HSV-1 et HSV-2, ainsi que le cytomégalo virus murin, contenant des génomes riches en motifs CpG,

sont capables d'activer la production de cytokines et d'interféron de type I après stimulation de TLR9 (Hochrein et al., 2004 ; Lund et al., 2003). Quelques études ont été réalisées chez l'homme montrant que ces agonistes peuvent être efficaces dans les maladies allergiques, le cancer ou comme adjuvant vaccinal (Klinman et al., 2004). Différentes voies de signalisation sont impliquées pour ces récepteurs : une voie dépendante de MyD88-TRAF6-IRF5 et une voie dépendante de MyD88-TRAF6-TAK1-MAPK/IKK-AP-1/NF- $\kappa$ B. IRF7 peut également être activé par TLR7 et TLR9 mais cette voie reste encore mal connue.

## **7. TLR11**

Des études récentes ont montré que TLR11 est le récepteur de protéines profiline-like de *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky et al., 2005) et que la résistance aux infections par le *Toxoplasma gondii* est due à la production de l'IL-12 via l'activation d'une voie dépendante de MyD88. TLR11 a aussi été montré comme étant impliqué dans les mécanismes de défense de l'hôte (Zhang et al., 2004).

## **V. TLRs et ligands endogènes**

Certaines études suggèrent que ces récepteurs pourraient de plus reconnaître des molécules endogènes qui sont capables de déclencher une réponse inflammatoire. La plupart de ces molécules proviennent des cellules mortes ou tumorales. Elles correspondent à des fragments de molécules de la matrice extracellulaire, à des protéines de choc thermique ou des peptides antimicrobiens pouvant stimuler les TLR de surface. Le clivage par exemple des composants de matrice extracellulaire (tels que les protéoglycanes, l'acide hyaluronique ou la fibronectine) par les protéases induit leur libération dans le milieu extracellulaire et leur reconnaissance par le TLR2 ou le TLR4 ou les deux ensemble en activant la production des cytokines et des chimiokines par la cellule. En plus des composants de la matrice cellulaire, d'autres composants cellulaires tels que les HMGB1 qui sont libérés par les cellules nécrotiques, peuvent être reconnues par le TLR2, TLR4 et ou le TLR9 (Yang et al., 2009). L'implication de ces TLR dans la reconnaissance des molécules endogènes, montre leur rôle dans l'inflammation dans des conditions non infectieuses. De même, il a été montré que des composants nucléaires tels que la chromatine, des ribonucléotides libérés par des cellules mortes, peuvent stimuler des TLR intracellulaires tels que le TLR7 et le TLR9 ce qui pourrait mener au développement des maladies auto-immunes.



## VI. Signalisation des TLR

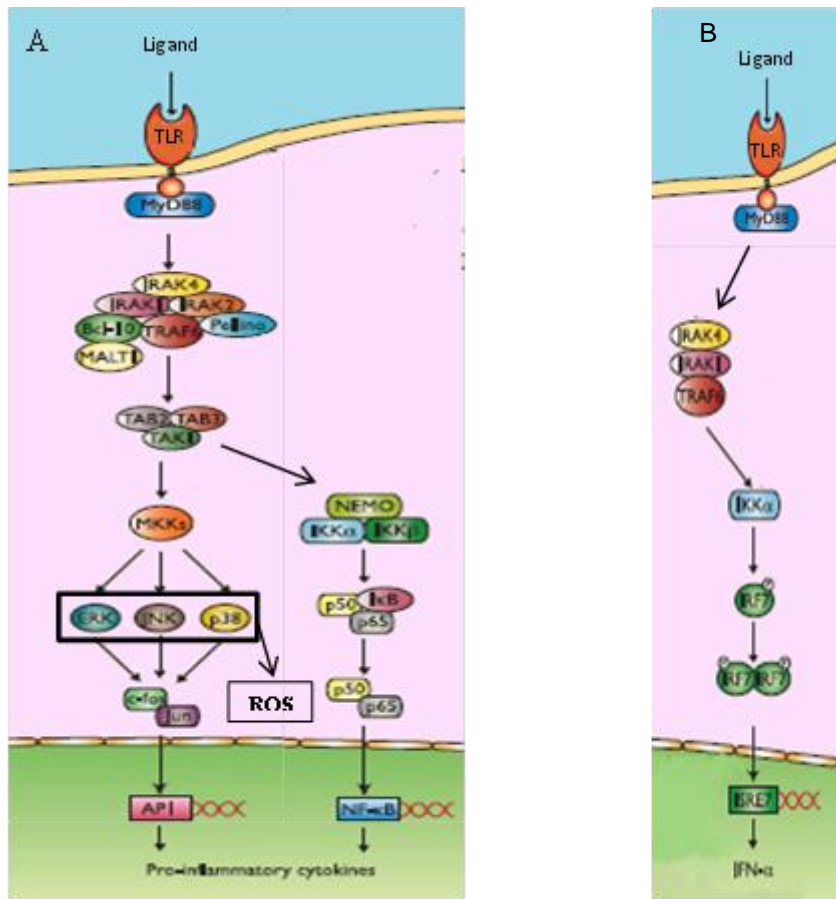
La stimulation des différents TLR par leurs ligands induit la transduction du signal qui conduit à l'activation des MAPKs (mitogen-activated protein kinases), de NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B) qui induit la production des cytokines, et des facteurs IRF (interferon regulatory factors) (IRF3 ou IRF7) qui engendrent l'expression d'interféron de type I. Chaque TLR induit une voie de signalisation spécifique en réponse à son ligand, par exemple le TLR3 et le TLR4 induisent la production des cytokines et l'expression d'interféron de type I, tandis que les TLR de surface (TLR1, TLR2, TLR5 et TLR6) génèrent plutôt des cytokines inflammatoires. La variabilité de réponse entre les TLR a été explorée par la découverte des protéines adaptatrices contenant elles-mêmes le domaine TIR. Ce domaine qui forme la partie intracellulaire des TLRs, joue un rôle essentiel dans la signalisation en leur permettant l'interagir avec les protéines adaptatrices.

Les voies de signalisation activées par les TLR font intervenir jusqu'à présent cinq protéines adaptatrices exprimant le domaine TIR : **MyD88** (pour Myeloid differentiation primary response protein), **TRIF** (Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor inducing IFN- $\beta$  ou TICAM1 pour Toll-like receptor adaptor molecule 1), **TIRAP** (TIR domain-containing adaptor protein ou MAL pour MyD88 adaptor-like), **TRAM** (TRIF-related adaptor molecule) et **SARM** (pour Sterile alpha- and armadillo-motif-containing protein) (Akira et al., 2004 ; O'Neill et al., 2007). MyD88 est la première protéine adaptatrice à domaine TIR qui a été identifiée. Elle est utilisée par tous les TLR à l'exception du TLR3 qui utilise uniquement TRIF, avec la particularité pour le TLR4 d'utiliser en plus TRIF, TIRAP et TRAM (Kawai et al., 2006). La voie de signalisation MyD88 active en aval par différents chemins transductionnelles le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, AP-1 (Activator-protein 1) et les MAPK permettant la production des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires (Akira et al., 2006 cell). Par contre la voie TRIF active les facteurs de transcription IRF3 et NF- $\kappa$ B permettant la production de l'interféron de type I et des cytokines inflammatoires. TRAM et TIRAP jouent un rôle essentiel dans l'adressage de TRIF au TLR4 et de MyD88 au TLR2 respectivement.

Mise à part le TLR4 qui fait intervenir toutes les protéines adaptatrices activant la voie de signalisation MyD88 et la voie TRIF dépendantes, les voies de signalisation en aval des autres TLR peuvent être classifiées en voie MyD88-dépendante ou voie TRIF-dépendante.

## 1. Voie de signalisation MyD88 dépendante

Après la stimulation du TLR par son propre ligand, la protéine MyD88 va jouer le rôle d'adaptateur entre les TLR et ces kinases. En effet elle s'engage via son domaine (TIR) avec le TLR et via son domaine de mort (DD pour death domain) avec les sérine/thréonine kinases à domaine DD de la famille IRAK (IL-1R-associated kinase). La première étape de l'activation de la voie en aval de MyD88 correspond au recrutement d'IRAK4 qui permet la phosphorylation et l'association d'IRAK1 et/ou IRAK2 (Li et al., 2002). Une fois phosphorylée, IRAK1 interagit avec la protéine TRAF-6 (tumour necrosis factor receptor-associated factor 6) (Suzuki et al., 2002). L'activation de TRAF6 induit une forte activation de NF $\kappa$ B et des MAPK (Kawagoe et al., 2008) mais aussi d'IRF7. La polyubiquitination de TRAF6 lui permet ainsi de s'associer au complexe formé par des protéines adaptatrices, TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase), TAB1 (TAK1-binding protein 1), TAB2 et TAB3 (Shibuya et al., 1996 ; Takaesu et al., 2000 ; Besse et al., 2007). Ce complexe ainsi activé entraîne la phosphorylation des kinases IKK $\alpha/\beta$  qui phosphorylent alors I $\kappa$ B, (inhibiteur cytoplasmique de NF- $\kappa$ B), ce qui provoque la translocation nucléaire des sous-unités p50/p65 du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Muzio et al., 2000) permettant la production des cytokines inflammatoires. Le complexe TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 peut également phosphoryler des protéines MAP kinases (MKK) (Yamaguchi et al., 1995) qui phosphorylent à leur tour les MAPK p38, JNK (c-Jun N-terminal kinases) (Kyriakis et al., 2001) et ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase1/2) en réponse aux TLRs en activant les membres de la famille AP-1 (Activator Protein-1) qui représentent la cible principale des MAPKs mais aussi en primant la NADPH oxydase des PN pour induire la production des ROS en réponse à l'activation du TLR4 par le LPS (Picard et al., 2003) (Figure 7 A).



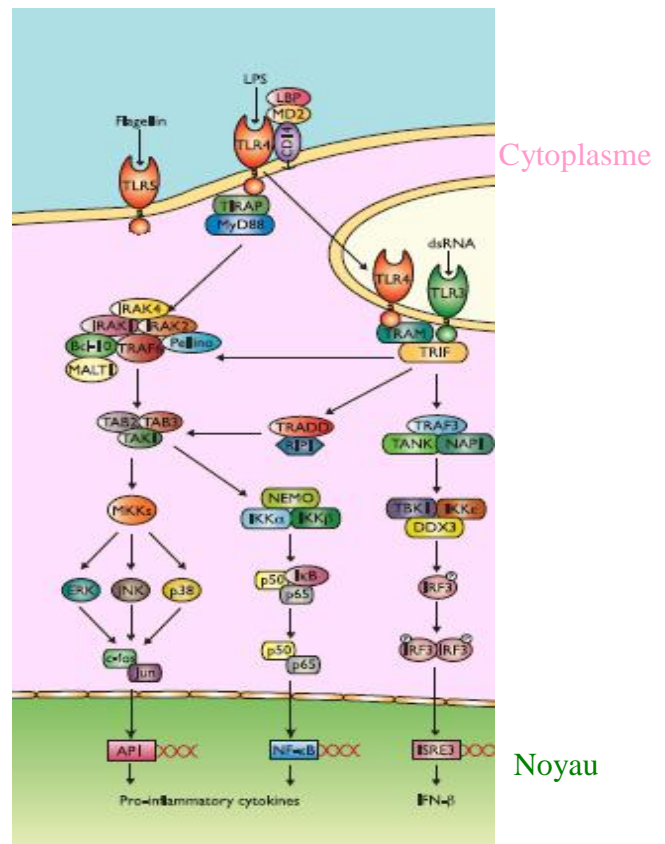
**Figure 7. Les voies MyD88 dépendantes.** A : Voie activant les MAPK et NFκB, B : Voie activant IRF7 (Adaptée d'un schéma du catalogue *invivogen* 2011).

Parallèlement, la phosphorylation d'IKK conduit à la phosphorylation des IRF, membres de la famille de facteurs de transcription capables de reconnaître la région ISRE (IFN-stimulated response elements) du promoteur des gènes induits par ces IFN. Une fois phosphorylés, ces facteurs de transcription vont transloquer vers le noyau et se lient aux régions ISRE ce qui déclenche l'expression de l'interféron de type I et/ou de gènes induits par l'interféron (Akira et al., 2006) (Figure 7 B). La stimulation des TLR7 et 9 conduit à la production d'IFN de type I via IRF7.

## 2. Voie de signalisation TRIF-dépendante

Cette voie fait intervenir la protéine TRIF a domaine TIR qui recrute et active directement TRADD, TRAF6 ou TRAF3. Chacune de ces trois protéines adaptatrice déclenche une voie de signalisation différente en réponse aux ligands des deux TLR 3 et/ou 4. TRADD se lie à RIP1 qui a subi une polyubiquitination ce qui permet l'activation de TAK1. Des études récentes ont montré que les cellules déficitaires en TRADD ou RIP1 engendrent une perte accrue de l'activation du facteur de transcription NFκB (Pobezinskaya et al., 2008 et Ermolaeva et al., 2008). L'interaction RIP1/TRADD est donc responsable de l'induction de NF-κB dans la voie de signalisation faisant intervenir TLR3 (Figure 8). L'activation de TAK1 qui peut être induite aussi par TRAF6 permet d'une façon similaire à la voie de MyD88-dépendante, l'activation des MAPK et d'IKK qui mène à l'activation de NFκB pour assurer la production des cytokines inflammatoires.

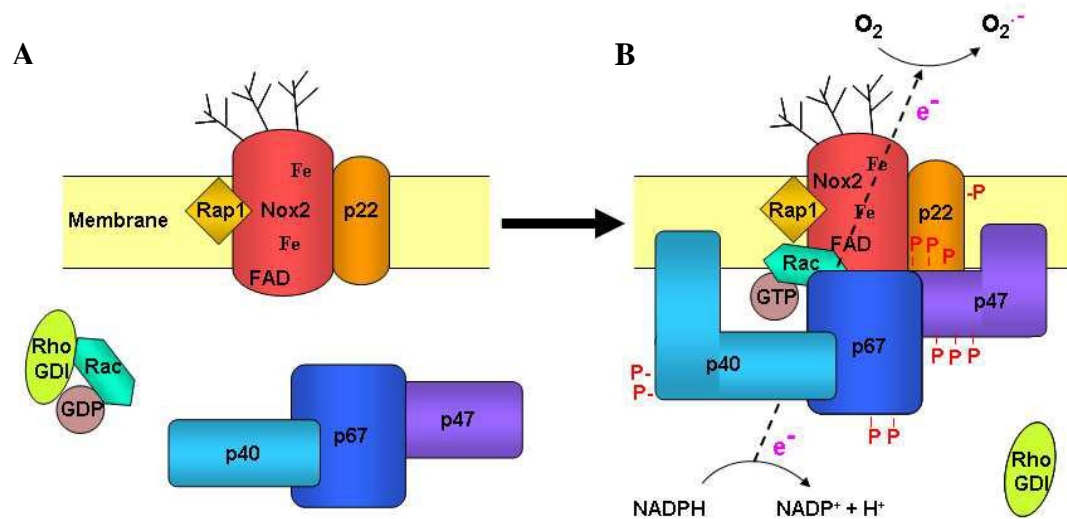
De plus de son rôle dans l'activation des MAPK, la voie de TRIF-dépendante peut induire l'activation d'IRF3 et donc la transcription de l'interféron-β. Cette voie implique des IKKε qui permettent la phosphorylation d'IRF3 et sa translocation vers le noyau (Hacker et al., 2006) (Figure 8).



**Figure 8. La voie TRIF dépendante (les voies TRADD, TRAF6 et TRAF3)**

## C. LA NADPH OXYDASE PHAGOCYTAIRE

La NADPH oxydase est un complexe multi-protéique initialement découvert dans les phagocytes (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, monocytes et macrophages). Elle catalyse le transfert d'électrons de son substrat, le NADPH, à l'accepteur final l'oxygène, entraînant la production d'anions superoxyde précurseurs des autres FRO qui sont toxiques pour les micro-organismes préalablement phagocytés. Lorsque les PN sont au repos, la NADPH oxydase est inactive et ses composants sont dispersés entre différents compartiments cellulaires. La NADPH oxydase est composée d'un élément membranaire, le cytochrome b558 (constitué de la gp91phox et la p22phox), de protéines cytosoliques p47phox, p67phox et p40phox (phox pour « phagocyte oxidase ») qui sont associées dans le cytosol (Lapouge et al., 2002) et d'une petite protéine G Rac1 ou Rac2 (dans les monocytes ou les PN, respectivement) liée à son inhibiteur RhoGDI (Rho Guanosine-5'-diphosphate dissociation inhibitor) (Kwong et al., 1993) (Figure 9). Les composants membranaires se trouvent à la fois dans les membranes des granulations spécifiques et la membrane plasmique (Borregaard et al., 1983), et les composants cytosoliques (p47phox, p67phox et p40phox) forment un complexe d'environ 240 kDa dans le cytosol dans le cytosol des PN au repos (Park et al., 1992). Lors de l'activation des PN par des agents pathogènes ou par des agonistes solubles, une série d'interactions protéine-protéine et protéine-lipide se produisent. Les facteurs cytosoliques p47phox, p67phox et p40phox subissent des événements de phosphorylation et migrent vers les membranes où ils se fixent au cytochrome b558. Rac2 subit de même une translocation à la membrane, convertie sous sa forme active liée à une molécule de GTP (guanosine-5'-triphosphate) (Quinn et al., 1993). L'assemblage des différentes sous-unités déclenche l'activité oxydase avec transfert des électrons du NADPH cytosolique vers l'oxygène via une molécule de FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) et les hèmes du cytochrome b558 (Figure 9).



**Figure 9: Modèle d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire.** (A) La NADPH oxydase dans les cellules au repos. Elle est constituée de protéines cytosoliques (la p67phox, la p47phox, la p40phox et Rac2 (ou Rac1)) et de protéines membranaires (la gp91phox et la p22phox qui forment le cytochrome b<sub>558</sub>). (B) Après l'activation, les composants cytosoliques migrent vers la membrane pour s'associer avec le cytochrome b<sub>558</sub>.

## I. Structure

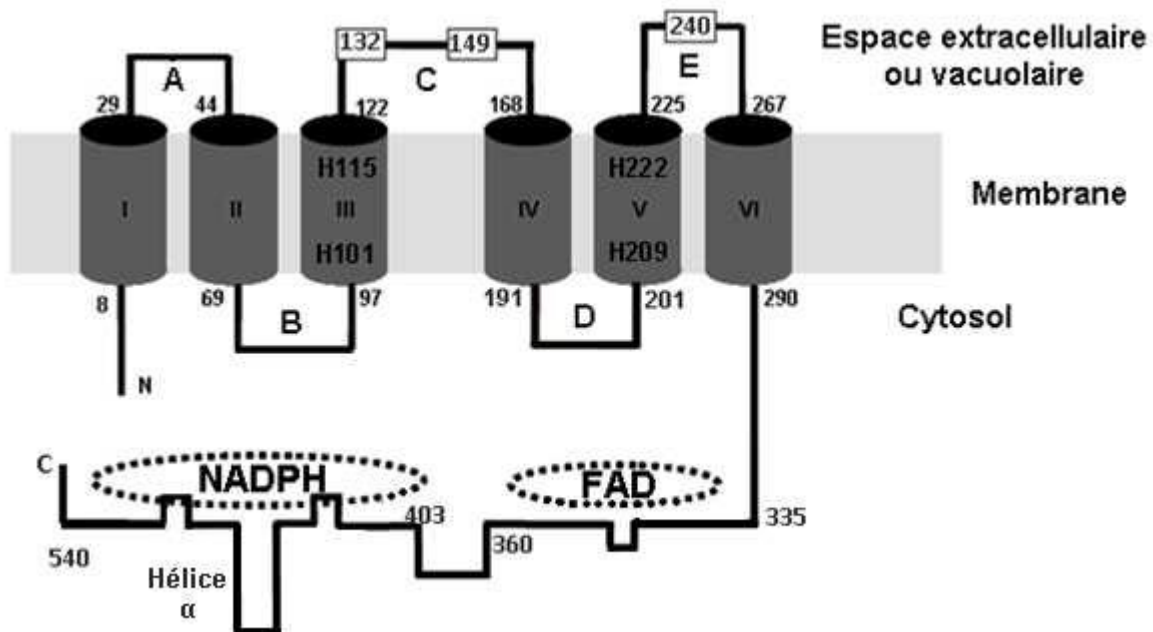
### 1. Le flavocytochrome b558

Le cytochrome b558 est le centre catalytique de l'enzyme qui doit son nom à son spectre d'absorption comprenant une bande  $\alpha$  à 558 nm (Cross et al., 1984). C'est une flavohémoprotéine intégrée à la membrane, constituée de deux sous-unités : la sous-unité  $\alpha$  ou p22phox et la sous-unité glycosylée  $\beta$  ou gp91phox ou Nox2 (Parkos et al., 1987 ; Huang et al., 1995). Les deux sous-unités sont assemblées selon une stoechiométrie 1 :1. Le cytochrome b558 porte un FAD (flavin adenine dinucleotide) et deux groupements prosthétiques héminiques (Sumimoto et al., 1992 ; Segal et al., 1992 ; Quinn et al., 1992a ; Cross et al., 1995b). Cette hémoflavoprotéine a un potentiel d'oxydoréduction très bas (-245 mV) ce qui lui permet de réduire directement l'oxygène de l'air (Rotrosen et al., 1992). La réaction de transfert d'électrons se déroule en deux étapes : une première étape de transfert d'un électron du NADPH au FAD (activité diaphorase) suivie d'une seconde étape via les groupements héminiques pour finalement réduire l'oxygène en O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Figure 9) (Doussi re et al., 1996 ; Li et al., 1997). Dans les neutrophiles au repos, la plupart du cytochrome b558 est

concentrée dans les granules spécifiques, et seulement 5 à 20 % sont ancrés à la membrane plasmique (Ginsel et al., 1990). Lors de l'activation du neutrophile, les granules fusionnent à la fois avec la membrane de la vacuole phagocytaire mais aussi avec la membrane plasmique (Morel et al., 1985).

### c) NOX2/gp91phox

La sous-unité gp91phox ou NOX2 est une glycoprotéine de 570 acides aminés (aa) chez l'homme (60 kDa correspondent à la protéine et 31 kDa aux glucides). La gp91phox possède une courte séquence N-terminale cytosolique, 6 régions transmembranaires, 3 sites de glycosylation dans les boucles extramembranaires (dans le PN la glycosylation est effectuée sur trois des cinq sites potentiels de N-glycosylation : Asn132, Asn149, Asn240 (Harper et al., 1985 ; Wallach et al., 1997)), deux boucles intracytosoliques dont une serait impliquée dans l'interaction entre NOX2 et p47phox (DeLeo et al., 1995a) et une deuxième boucle qui participe au transfert des électrons du FAD aux hèmes (Li et al., 2005) et finalement une longue séquence cytosolique de 275 aa qui contient deux séquences de liaison l'une pour le NADPH et l'autre pour le FAD (Vignais et al., 2002 ; Paclet et al., 2007) (Figure 10).



*Figure 10 : Modèle structural de Nox2.*

Le gène CYBB qui code pour NOX2 est localisé sur le bras court du chromosome X (Royer-Pokora et al., 1986). Cette protéine est exprimée essentiellement dans les cellules myéloïdes, mais elle est exprimée faiblement dans d'autres cellules comme les neurones, les cellules endothéliales, les cellules hépatiques... (Bedard et al., 2007)

La gp91phox/NOX2 constitue le corps catalytique de l'enzyme, elle catalyse le transfert des électrons du substrat NADPH à l'oxygène moléculaire O<sub>2</sub>, par l'intermédiaire de la flavine FAD et des groupements hémiques prosthétiques, pour générer l'anion superoxyde «O<sub>2</sub><sup>-</sup>». Dans l'enzyme active, le transfert des électrons du NADPH à l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) se fait dans l'ordre suivant :



Ce transfert d'électrons est stimulé par les protéines cytosoliques p67phox (par son domaine d'activation) et par Rac-GTP. Notre équipe a récemment montré que la gp91phox est phosphorylée dans les PN humains activés et que son activité enzymatique est augmentée par cette phosphorylation (Raad et al., 2009).

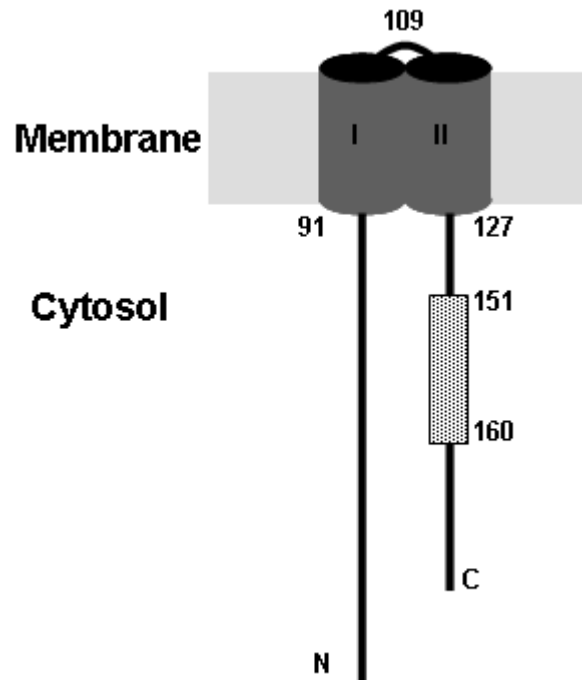
La maturation complète de Nox2 requiert la présence de p22phox qui facilite sa glycosylation et la stabilise (Yu et al., 1997 ; Maly et al., 1993).

#### **d) Sous-unité p22phox**

La sous-unité p22phox est une protéine de 21 kDa et de 195 acides aminés chez l'homme. Elle contient 2 régions transmembranaires (Davis et al., 1998) et une région cytosolique riche en prolines (de type PXXP) (Figure 11) qui interagit avec les domaines SH3 (src homology region 3) (Leto et al., 1994). Cette protéine n'est pas le centre redox de l'oxydase mais elle est indispensable à la maturation du cytochrome b558 et à l'assemblage du complexe oxydase. Elle participe en effet à la stabilité de la gp91phox ainsi qu'à la formation du complexe NADPH oxydase actif (Deleo et al., 2000). Elle interagit directement via son domaine PRR avec les facteurs cytosoliques, notamment avec les domaines SH3 de la p47phox (Leusen et al., 1994a ; Dahan et al., 2002).



Elle est codée par le gène CYBA situé sur le bras long du chromosome 16 (Dinauer et al., 1990). Son ARNm a été détecté dans plusieurs types cellulaires, son expression n'est pas spécifique aux cellules myéloïdes.

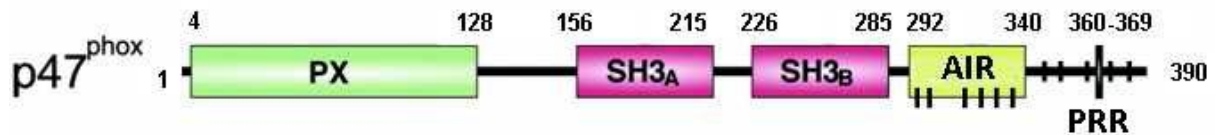


**Figure 11 : Modèle structural de p22phox.** La région PRR est représentée par un rectangle (aa151-aa160).

## 1. Les facteurs cytosoliques de la NADPH oxydase phagocytaire

### a) Sous-unité p47phox

Chez l'homme la p47phox est une protéine de 390 acides aminés, de 47 kDa, elle est hautement basique ( $pI \approx 10.4$ ) car elle possède de nombreux résidus arginines et lysines. La p47phox possède quatre domaines fonctionnels: 1 domaine PX (10 si phox homology) en N-terminal (aa 4-128), 2 domaines SH3 (Src homology domain 3) en tandem (aa 159-213) et (aa 229-283), 1 domaine auto-inhibiteur AIR (auto-inhibitory region) (aa 292-340), 1 domaine riche en proline PRR (proline-rich region) : (aa 360-369) en C-terminal (Figure 12). La partie C- terminale contient 10 sites potentiels de phosphorylation (aa 303-379).



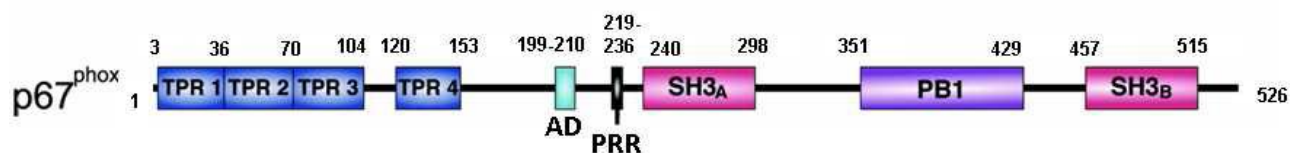
**Figure 12 : Domaines structuraux de p47phox.** Les acides aminés sérines phosphorylés au cours de l'activation sont indiqués par un tiret noir. (D'après Groemping et Rittinger, 2005)

Cette protéine cytosolique joue un rôle critique dans l'assemblage de la NADPH oxydase en permettant la translocation de la p67phox et p40phox à la membrane. En effet, la translocation de la p47phox se déroule normalement dans les neutrophiles déficients en p67phox alors que la p67phox reste cytosolique dans les neutrophiles déficients en p47phox (Heyworth et al., 1991).

Le gène qui code pour cette protéine s'appelle NCF1 et le transcrit est un ARNm exprimé essentiellement dans les cellules phagocytaires.

#### **b) Sous-unité p67phox**

La protéine p67phox est une protéine de 526 acides aminés, de 59,8 kDa chez l'homme. L'association de la p67phox au cytochrome b558 est essentielle à l'activité oxydase elle est considérée comme l'activateur du complexe oxydase (Vergnaud et al., 2000 ; Li et al., 2007). Elle contient quatre domaines TPR "Tetratricopeptide Repeat", un domaine activateur AD «Activation Domain», un domaine PB1 «Phox and Bem 1», deux domaines SH3 (un au milieu de la protéine et l'autre près de l'extrémité C-terminale), et une région riche en prolines. La quantité de la p67phox est inférieure de 2 à 3 fois à celle de la p47phox. La majorité de la p67phox semble être liée à la p47phox et la p40phox. Elle est phosphorylée pendant l'activation et migre avec la p47phox au niveau de la membrane (Figure 13).

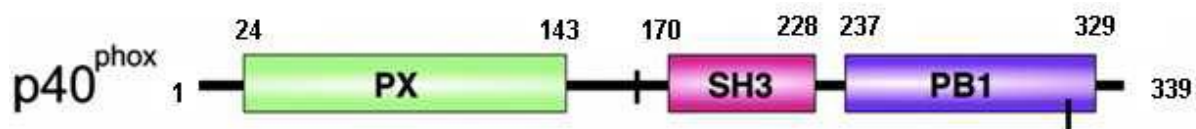


**Figure 13 : Domaines structuraux de p67phox.** La localisation de l'acide aminé Thr233 phosphorylé au cours de l'activation est indiquée par un tiret noir. AD : « activation domain ». (D'après Groemping et Rittinger, 2005).

Le gène codant pour cette protéine s'appelle NCF2 et donne un ARNm de taille 2.4 kb (Francke et al., 1990).

### c) Sous-unité p40phox

La protéine cytosolique p40phox est une protéine de 339 acides aminés et de 40 kDa dont l'expression est essentiellement restreinte aux cellules myéloïdes (Wientjes et al., 1993 ; Zhan et al., 1996). L'étude de la structure de la p40phox (Tsunawaki et al., 1994) a montré qu'elle possède trois domaines fonctionnels un domaine N-terminal PX spécifique au PI(3)P, un domaine SH3 et un domaine PB1 en C-terminal (Figure 14).



**Figure 14 : Domaines structuraux de p40phox.** (D'après Groemping et Rittinger, 2005)

Le gène codant pour la p40phox est localisé sur le chromosome 22. L'expression des ARNm est limitée aux cellules hématopoïétiques à l'exception des cellules érythrocytaires (Zhan et al., 1996). La fonction exacte de la p40phox reste à déterminer. De nombreuses hypothèses ont été émises sur un rôle stimulateur ou inhibiteur de la NADPH oxydase, son rôle stimulateur semble maintenant admis (Chessa et al., 2010).

### d) Sous-unité Rac

La protéine Rac est composée de 192 acides aminés, et a un poids moléculaire de 21 kDa. Elle est codée par le gène RAC2. La protéine Rac (protéine G monomérique), membre de la famille des petites GTPases Rho, est un élément essentiel à la régulation d'une grande variété

de processus cellulaires importants comme l'organisation du cytosquelette, l'orientation et la migration cellulaire. Il existe 3 protéines Rac: Rac1 est exprimée ubiquitairement (Moll et al., 1991), Rac2 est spécifique des cellules hématopoïétiques (Didsbury et al., 1989; Moll et al., 1991) et Rac3 est trouvée dans le cerveau mais aussi dans le cœur, le placenta et le pancréas (Haataja et al., 1997). Rac1 et Rac 2 ont 92% d'identité de séquence d'acides aminés (Didsbury et al., 1989). Elles jouent un rôle très important dans la formation du complexe NADPH oxydase actif (Heyworth et al., 1993). La protéine Rac2 possède un domaine RHO (Ras homology domain) (a.a. 6-179) qui renferme toutes les séquences nécessaires à l'activité des protéines de la famille Ras-like qui sont : un domaine effecteur (a.a. 143-192), un domaine appelé «Insert region» (a.a. 124-135) et un troisième appelé «effecteur Ras-Like» (a.a. 26-45). Dans les PN humains, Rac2 est la forme prédominante (Knaus et al., 1991; Heyworth et al., 1993), elle joue un rôle critique dans la régulation du cytosquelette d'actine (Cassimeris et al., 1992) et un rôle important dans la génération de l'anion superoxyde par la NADPH oxydase (Heyworth et al., 1994; Dorseuil et al., 1996). Pendant son activation, cette enzyme transloque à la membrane sous sa forme active: Rac-GTP, après sa dissociation de la protéine GDI (GDP-Dissociation-Inhibitor) (Geiszt et al., 2001). Sa translocation est indépendante de celle des composants cytosoliques de la NADPH oxydase. Il a été suggéré que la translocation de Rac dans des neutrophiles déficients en NOX2 est moins importante, ce qui laisse supposer qu'elle interagit avec le cytochrome b<sub>558</sub> (Heyworth et al., 1994). La p67phox interagit préférentiellement avec Rac2 plutôt qu'avec Rac1 (Dorseuil et al., 1996). L'association de Rac2 à p67phox et au cytochrome b<sub>558</sub> va permettre l'activation de l'oxydase.

## **II. Les kinases qui contrôlent la phosphorylation des composants de l'oxydase et son activation**

### **1. La protéine kinase C**

La protéine kinase C (PKC) est une sérine/thréonine kinase, qui phosphoryle les protéines au niveau des séquences consensus: -R/KXS/T- ou S/TXR/K-. La PKC est une famille de 11 isoformes classées en 3 groupes sur la base de leur structure et leur mode d'activation : 1) les PKC classiques ou conventionnelles (cPKC) ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II, et  $\gamma$ ), celles-ci requièrent le Ca<sup>2+</sup>, le diacyl glycérol (DAG) et la phosphatidylsérine pour leur activation, les PKC nouvelles

(nPKC) ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , et  $\theta$ ) qui utilisent le DAG et PS mais pas le  $\text{Ca}^{2+}$  pour leur activation, et les PKC atypiques (aPKC) ( $\text{M}\zeta$ ,  $\iota$  et  $\lambda$ ) qui ne requièrent ni le  $\text{Ca}^{2+}$ , ni le DAG pour leur activation (Mellor et al., 1998; Nishizuka et al., 1995, 1986; Dekker et al., 1994). Les PKC sont impliquées dans de nombreux processus de signalisation. Le rôle des PKC dans la transduction du signal a été étudié grâce au fait que ces kinases sont des récepteurs aux esters de phorbol (Castagna et al., 1982) largement utilisés pour une activation directe des PKC. Quand les PN sont stimulés par le PMA, celui-ci active directement la PKC et induit une forte production d' $\text{O}_2^-$ , ainsi qu'une forte phosphorylation de la p47phox et de la p67phox. Les inhibiteurs de PKC (staurosporine, GF109203X) inhibent fortement la production d' $\text{O}_2^-$ , le transfert à la membrane et la phosphorylation de la p47phox et de la p67phox (Nauseef et al., 1991). Les PN expriment constitutivement 3 formes de PKCs conventionnelles  $\alpha$ ,  $\beta\text{I}$ ,  $\beta\text{II}$ , une isoforme de PKC nouvelle  $\delta$  et une isoforme atypique  $\zeta$  (Kent et al., 1996). Plusieurs données dans la littérature ont étudié les fonctions des PKCs dans les PN et suggéré qu'elles jouent un rôle dans l'activation de l'oxydase. En effet, les isoformes de PKC $\alpha$ ,  $\beta\text{1}$ ,  $\beta\text{2}$ ,  $\zeta$  et  $\delta$  s'activent lors de la stimulation par le fMLP ou le PMA et migrent à la membrane de façon corrélée avec l'activation de la NADPH oxydase (Curnutte et al., 1994; Nixon et al., 1999). Cependant, l'isoforme de PKC la mieux caractérisée est la PKC $\beta$  qui est l'isoforme la plus abondante dans le PN. Ainsi celle-ci peut phosphoryler la p47phox. Une interaction directe entre la PKC et la partie C-terminale de la p47phox a été mise en évidence (Reeves et al., 1999). Notre équipe a montré que la PKC $\zeta$  est impliquée dans les voies de signalisation conduisant à l'activation de la NADPH oxydase en phosphorylant la p47phox via les récepteurs du fMLF et par la suite joue un rôle dans la régulation de la fonction bactéricide du PN (Dang et al., 2001). Notre équipe a montrée aussi que toutes les PKC exprimées dans le PN phosphorylent la p47phox en système *in vitro*, et induisent une liaison de celle-ci avec la p22phox et sont capables par conséquent d'induire la production d' $\text{O}_2^-$  *in vitro* (Fontayne et al., 2002). Fuchs a montré une phosphorylation de la p40phox par la PKC (Fuchs et al., 1997). D'ailleurs, d'autres auteurs ont montré que dans les monocytes stimulés par le zymosan opsonisé, la p67phox est phosphorylée par la PKC (plus précisément la PKC $\delta$ ) jouant par la suite un rôle important dans la génération d'anion superoxyde (Zhao et al., 2005).

## 2. Les MAP kinases

Les MAP kinases (Mitogen Activated Protein kinases) sont des protéines ubiquitaires impliquées dans des fonctions cellulaires variées. Trois grandes familles de MAP kinases (ERK1/2, p38, c-Jun N-terminal kinase ou JNK) ont été identifiées, qui correspondent à des voies de signalisation en cascade. Ces voies de signalisation jouent des rôles importants dans les fonctions cellulaires : de l'apoptose à la prolifération, différenciation, voire même la plasticité neuronale. La p38MAPK et les ERK1/2 sont les plus impliquées dans l'activation de la NADPH oxydase. Les données de la littérature montrent que ces kinases sont impliquées dans le priming de l'explosion oxydative (McLeish et al., 1998) mais aussi dans l'activation de la NADPH oxydase (El Benna 1996a, b; Krump 1997) et la production des FRO. Notre équipe a montré que ERK1/2 jouent un rôle prédominant dans la phosphorylation de la p47phox lorsque les PN sont activés par du fMLF (Dewas et al., 2000) et que ERK1/2 et p38 sont aussi impliquées dans la phosphorylation de la p47phox induite par le GM-CSF et le TNF $\alpha$  ; elles sont aussi impliquées dans la phosphorylation de la p67phox (Dang et al., 2003).

## 3. Les PI3 kinases

Les PI3K forment une famille d'enzymes hétérodimériques phosphorylant des phosphoinositides membranaires (PI), sur la position 3 du groupement inositol. Les PI3 kinases sont ubiquitaires et jouent un rôle pivot dans la régulation de nombreux processus cellulaires. Elles sont réparties en trois classes majeures sur la base de leur structure et de la spécificité de leurs substrats, et sont généralement constituées d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice : La classe I : les enzymes de cette classe sont sensibles à la wortmannin et peuvent utiliser le PI, le PI(4)P et le PI(4,5)P<sub>2</sub> comme substrats *in vitro*. Le substrat majeur *in vivo* apparaît être le PI(4,5)P<sub>2</sub> - La classe II : les enzymes de cette classe peuvent phosphoryler le PI et le PI(4)P *in vitro* et montrent des réponses variables à la wortmannin. Cette classe d'enzymes contient un domaine C2 en C-terminal qui lie les phospholipides d'une manière Ca<sup>2+</sup> dépendante. La classe III : Les PI3 kinases de la classe III comprennent le Vps34 qui phosphoryle le PI(3)P. L'homologue humain de Vps34 est sensible à la wortmannin et participe à la régulation du trafic membranaire endocytaire. Les PI3-kinase activent le phosphoinositol (PI) pour produire le PI(3)P, PI(3,4)P<sub>2</sub>, et le PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Ces molécules agissent comme des seconds messagers et recrutent la PDK1 (une

serine/thréonine kinase PI3K-dépendant) et l'Akt du cytoplasme à la membrane plasmique (Dong et al., 1999; Lawlor et al., 2001; Scheid et al., 2003). Les PN possèdent deux classes de PI3Ks : l'hétérodimère classique p85/110 et une nouvelle PI3K régulée par la sous-unité  $\beta\gamma$  de la protéine G : La PI3K $\gamma$  (Stephens et al., 1994). Grâce à l'utilisation de leurs inhibiteurs spécifiques comme la wortmannin et le LY294002, Curnutte et collaborateurs ont mis en évidence l'implication et le rôle assurés par cette kinase dans l'activation de la NADPH oxydase et la dégranulation par les chimioattractants (Curnutte et al., 1994). Karlsson a montré que le PMA pouvait induire une production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> intracellulaire d'une façon dépendante de la PI3K (Karlsson et al., 2000). D'autre part, des PN de souris PI3K<sup>-/-</sup> ne produisent pas l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> lors d'une activation de l'oxydase par des facteurs chimiotactiques (Sasaki et al., 2000). La PI3K $\gamma$  est très rapidement activée dans les PN incubés avec l'IL-8 ou le fMLP (Naccache et al., 2000). La PI3K $\gamma$  et la production de PtdIns 3,4,5-P<sub>3</sub> sont impliquées dans les phénomènes de priming du PN par le TNF $\alpha$  et le GM-CSF (Cadwallader et al., 2002) et pourraient agir en augmentant la liaison à la membrane de la p40phox par son domaine PX (Ellson et al., 2001). Enfin, une corrélation existe entre l'activation des PI3K, la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et la phosphorylation de la p47phox dans les PN stimulés par du fMLF et primés avec du GM-CSF (Kodama et al., 1999).

#### **4. La protéine kinase A**

La protéine kinase A (PKA) est une kinase dont l'activation est dépendante de l'AMP cyclique (AMPc) (Smith et al., 1993). C'est une sérine/thréonine kinase qui phosphoryle au niveau des séquences consensus: -RRXS- ou -RRXT-. Elle a été impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires, y compris la transcription, le métabolisme, la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. Elle est composée de 4 sous-unités : deux sous-unités catalytiques et deux sous-unités régulatrices. Les sous-unités régulatrices inhibent l'activité de l'enzyme. Elles ont une affinité pour l'AMPc qui entraîne la dissociation des sous-unités catalytiques, qui sont alors libérées de l'inhibition par les sous-unités régulatrices. Si le taux d'AMPc diminue, les sous-unités régulatrices perdent leur ligand et reprennent leur liaison avec les sous-unités catalytiques et les inhibent à nouveau. Les données dans la littérature ont montré que la p47phox est un substrat pour la PKA. Ainsi, sa phosphorylation peut être induite par l'addition de dibutyryl-AMPc aux cytoplastes (PN sans noyau) ou au cytosol des

PN (Kramer et al., 1988). Cependant, l'élévation de l'AMPc dans le PN inhibe la production de FRO (Tyagi et al., 1991). La PKA en activant des phosphatases modulerait la phosphorylation de la p47phox, en accélérant sa déphosphorylation. Il a été montré en système acellulaire que l'addition de la p47phox recombinante phosphorylée par la PKA n'induit pas l'activation de l'oxydase in vitro (Park et al., 1997). Les données de Hwang montrent que la voie de l'AMPc/PKA joue un important rôle modulateur de l'explosion oxydative et de la dégranulation dans les PN activés par du fMLF (Hwang et al., 2003).

### **III. Les voies d'activation de la NADPH oxydase du PN (exemples fMLF et PMA)**

Les PN sont des cellules exposées à plusieurs stimuli ; leur rôle dans le système immunitaire nécessite qu'ils soient capables de reconnaître des facteurs endogènes et exogènes, synthétiques ou naturels, qui induisent l'activation de leurs fonctions entre autres la fonction oxydase. Lors de la phagocytose de microorganismes ou de particules opsonisées par le PN, la NADPH oxydase est activée (DeLeo et al., 1999). Les récepteurs de surface sont occupés par le microorganisme tout au long du processus de phagocytose et de digestion. L'activation de ces récepteurs initie les cascades de signalisation aboutissant à l'activation de l'oxydase. Le fMLF (peptide dérivé des protéines bactériennes) par exemple se lie à des récepteurs de surface spécifiques des formyl-peptides bactériens FPRs (formyl peptides receptors) et induit en aval de la protéine G, différentes cascades de signalisation dans les PN humains. Ces voies de signalisation engendrent :

- L'activation de la phospholipase PLC  $\beta$  qui réalise l'hydrolyse de PI(4,5)P<sub>2</sub> en diacylglycérol (DAG) et inositol-(1,4,5)-triphosphate (IP<sub>3</sub>) (Takenawa et al., 1985 ; Li et al., 2000). L'IP<sub>3</sub> entraînant une augmentation de la concentration cytosolique en calcium libre Ca<sup>2+</sup>,
- L'activation des PKC par le DAG ou le calcium, qui joue un rôle essentiel dans la phosphorylation des différents composants cytosoliques de la NADPH oxydase.
- La production de l'acide phosphatidique (PA) suite à la conversion du DAG par une diacylglycérol kinase (Ishitoya et al., 1987) ou par la phospholipase PLD. Le PA produit est d'une part impliqué directement dans l'activation de l'oxydase du fait de



son interaction avec la p47phox, et d'autre part il stimule l'activité de kinases telles que la PKC  $\zeta$  (Erickson et al., 1999) qui est capable de phosphoryler la p47phox en réponse au fMLF (Dang et al., 2001b).

- L'activation de PI3Ks qui catalyse la phosphorylation du phosphatidylinositol en phosphatidylinositol-3-phosphate PI3P et du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate PI(4,5)P2 en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate PI(3,4,5)P3 participent directement ou indirectement à la régulation de l'oxydase (Brown et al., 2003).

Tous ces évènements sont absolument requis pour une activité NADPH oxydase optimale. Selon le stimulus la production d'anion superoxyde varie.

Ainsi le fMLF induit une production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> rapide mais de courte durée, en relation avec une inactivation rapide des récepteurs FPR et des mécanismes de déphosphorylation.

La stimulation des PN par les esters de phorbols comme le PMA induit l'activation de la protéine kinase C (PKC) dont l'activité oxydase qui en résulte présente une phase de latence et une cinétique forte et prolongée (en plateau). De ce fait, le PMA est devenu le contrôle positif le plus employé pour l'étude de l'activation du complexe NADPH oxydase. Ce sont les PKCs  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  qui participent à l'activation de l'oxydase induite par le PMA en phosphorylant des protéines cytosoliques (p22phox, p40phox, p47phox et p67phox).

## **IV. Activation du complexe NADPH oxydase**

### **1. Généralités**

En passant de la circulation sanguine au site infectieux, la NADPH oxydase des PN passe d'un état de repos total ou dormant à un état activé. Cependant, si le PN peut être brutalement activé par une bactérie par exemple, le passage à l'état activé se fait très probablement *in vivo* par une étape intermédiaire qui prépare à l'activation c'est le « priming ». De plus, après l'activation une étape d'arrêt et d'inhibition est nécessaire pour limiter l'activation dans le temps et aider à la résolution de l'inflammation (Figure 15).

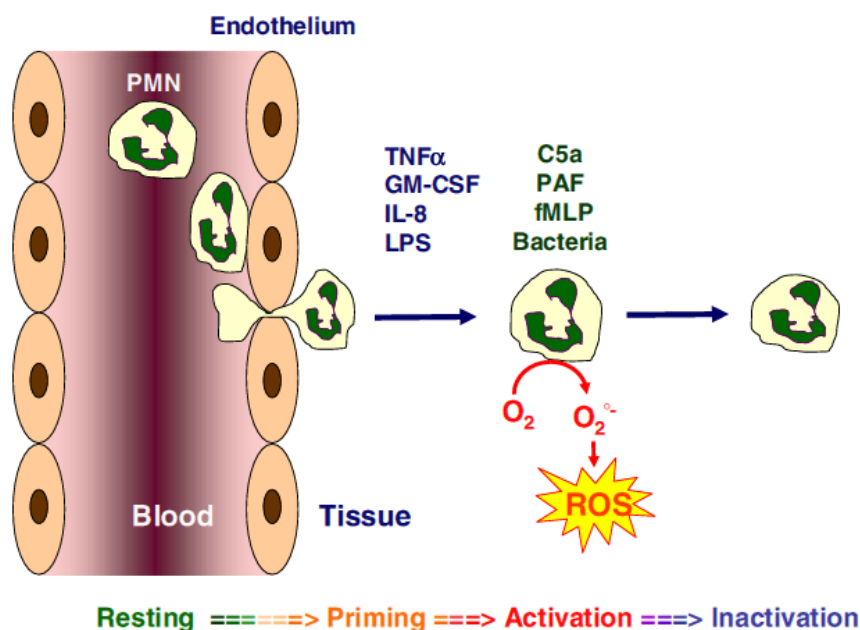
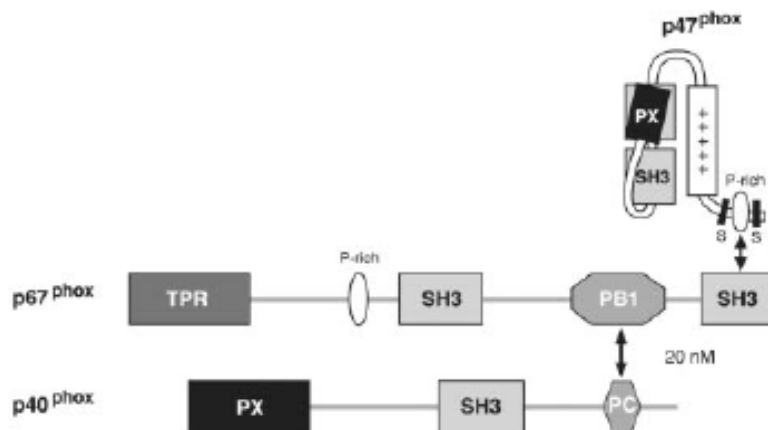


Figure 15. Les différents états d'activation des PN. (El Benna et al., 2008)

Les mécanismes d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire sont complexes. Ils requièrent la translocation des sous-unités cytosoliques p47phox, p67phox, p40phox et Rac à la membrane plasmique ou phagolysosomale pour former d'un complexe oxydatif actif (Figure 16). Sous l'influence de différents stimuli déclenchant différentes voies transductionnelles qui peuvent se recouper ou agir en synergie, ces composants transloquent vers la membrane où leur regroupement déclenche le transfert d'électrons à partir du NADPH sur l'oxygène moléculaire, source des différentes FRO (Formes Réactives de l'Oxygène). Le processus de translocation et d'assemblage du complexe actif nécessite l'activation de Rac, des phosphorylations réversibles d'acides aminés sérine et thréonine des composants cytosoliques p47phox, p67phox et p40phox, ainsi que des composants membranaires p22phox/gp91phox (Groemping et al., 2005 ; Raad et al., 2009), et des interactions moléculaires entre les sous-unités de la NADPH oxydase avec d'autres composants cellulaires comme le cytosquelette. La sous-unité p47phox joue le rôle d'organisateur en permettant la translocation de p67phox et p40phox à la membrane ; la régulation de l'activation de la NADPH oxydase est dépendante de la phosphorylation de cette sous-unité.

## 2. La NADPH oxydase au repos

Dans les PN circulants non stimulés, la NADPH oxydase est en état de repos et ses composants cytosoliques forment un complexe dans le cytosol. Ils interagissent entre eux via leurs domaines structuraux. Le flavocytochrome b558 est majoritairement (~ 80%) localisé dans les membranes des granules (spécifiques et vésicules sécrétoires), et seulement 5 à 20 % sont retrouvés au niveau de la membrane plasmique (Ginsel LA et al., 1990). La p47phox est maintenue sous une conformation autoinhibée en l'absence de phosphorylation (Yuzawa et al., 2004 a et b, Durand et al., 2006, Marcoux et al., 2009). Dans cette conformation, le domaine PX et la région auto-inhibitrice AIR interagissent simultanément avec le tandem SH3 de la protéine. Cette interaction intramoléculaire prévient le recrutement de la p47phox à la membrane en absence de stimulation. D'un autre côté, la p67phox se lie à la fois à la p40phox par les domaines PB1/PB1 ou PB1/PC et à la p47phox par une interaction SH3/PRR (Lapouge et al., 2002 ; Leto et al., 1994). Rac2 est aussi localisée dans le cytosol, elle se trouve liée à son inhibiteur RhoGDI (Rho Guanosine-5'-diphosphate dissociation inhibitor) (Kwong et al., 1993) (Figure 16).



**Figure 16. Les interactions moléculaires des sous unités de la NADPH oxydase à l'état non stimulé.** (Lapouge et al., 2002).

### 3. Le priming de la NADPH oxydase

Le priming peut être traduit par une pré-activation ou amorçage de la NADPH oxydase ; il est défini *in vitro* par le fait qu'un prétraitement par un premier stimulus à une concentration qui n'est pas capable d'induire la production de FRO par les PN, augmente la réponse à un second stimulus ajouté ultérieurement. Les premières observations d'un tel effet « primant » ont été faites en mettant en évidence une potentialisation de la production des FRO par le prétraitement des PN par des facteurs chimioattractants. Différents agents peuvent induire le priming de la NADPH oxydase comme certaines cytokines telles que le TNF $\alpha$ , le GM-CSF, l'IL-8, (Elbim et al., 1994), certains agonistes de TLRs comme le LPS (El Benna et al., 2008) (Tableau 4). Ces conditions de pré-activation augmentent la réponse à différents stimuli tels que le N-formyl-peptide, le C5a ou encore le PAF ou le LTB4. Ces phénomènes de « priming » sont aussi observés *ex vivo* après traitement de certains patients par du G- ou GM-CSF (Khwaja et al., 1992).

Un certain nombre de faits ont été décrits au cours du priming de la NADPH oxydase par différents agents. Ainsi, après prétraitement des PN par le TNF $\alpha$  ou le GM-CSF, ont été observés une augmentation de l'expression du récepteur au fMLF à la surface du PN (McColl et al., 1990), une activation des voies de la phosphoinositides 3-kinase (PI3K) et de la phospholipase D (PLD) (Cadwallader et al., 2002 ; Bourgoin et al., 1990). Par ailleurs, ces cytokines induisent le priming de la phospholipase A2 (PLA2) (Bauldry et al., 1991).

Agents	Priming	Activation
<b>Cytokines</b>		
TNF $\alpha$	+++	+?
GM-CSF	+++	—
IL-1 $\beta$	++	—
IL-8	++	+?
IL-15	+	—
IL-18	++	—
<b>TLR agonists</b>		
LPS	+++	-?
LAMs	++	—
Lipopeptide	++	—
Flagellin	++	—
R848	++	—
Zymosan	++	+?
<b>Chemoattractants</b>		
fMLF	++	++
C5a	+	++
LTB4	++	+
PAF	++	+
<b>Chemical agents</b>		
PMA	+	+++
A23187	++	+
Cyto B	++	—
<b>Others</b>		
Peroxynitrite	++	—
Proteases	++	—
Adhesion	++	—
Fibronectin	+	—
Substance P	++	

**Tableau 4: Les différents agents primants et activateurs des PN (El Benna et al., 2008).**

Les conséquences directes du priming sur les composants de la NADPH oxydase et en particulier l'état de phosphorylation de la p47phox, étaient peu connues. Des résultats de notre équipe ont montré que la p47phox est partiellement phosphorylée dans les PN primés par le TNF $\alpha$  et le GM-CSF et que le degré de phosphorylation des autres sites est augmenté lors de l'application ultérieure d'un deuxième stimulus (fMLF) (Dang et al., 1999; Dewas et al., 2003). La nature des sites phosphorylés ainsi que les voies de signalisation impliquées dans ce mécanisme seront détaillée plus loin.

Le priming des PN par le TNF $\alpha$  ou le LPS induit la mobilisation du cytochrome b558 à partir des granules spécifiques vers la membrane plasmique par le biais de l'activation de la p38MAPK (DeLeo et al., 2000 ; Ward et al., 2000). L'activation ultérieure par le fMLF induit une translocation rapide et forte des composants cytosoliques à la membrane plasmique où ils se lient au cytochrome b558 déjà mobilisé (El Benna et al., 2008).

#### **4. Activation de la NADPH oxydase**

La production des FRO par les PN peut être induite par des agents solubles et particuliers. Les agonistes solubles qui induisent cette production sont le fragment du complément C5a, les N-formyl peptides d'origine bactérienne dont le prototype est le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLF), le leucotriène B4 (LTB4), le «platelet activating factor» (PAF), les endotoxines bactériennes, les ionophores calciques (comme le A23187), les esters de phorbol comme le phorbol myristate acétate (PMA), un activateur direct de plusieurs isoformes de PKC. Les agonistes particuliers qui stimulent la production des FRO sont les agents pathogènes comme les bactéries et le zymosan. Ces stimulants induisent une cascade de signaux faisant intervenir, des phospholipases et des kinases qui aboutissent à une forte phosphorylation de la p47phox dans la région C-terminale, à une faible phosphorylation de la p67phox et de la p40phox et à la libération de la protéine G rac2 de son inhibiteur Rho-GDI à la suite d'une substitution du GDP par GTP. Le tout (p47phox, p67phox, p40phox et rac2) migre vers la membrane pour former avec le cytochrome b558 la NADPH oxydase active (El Benna et al., 2010).

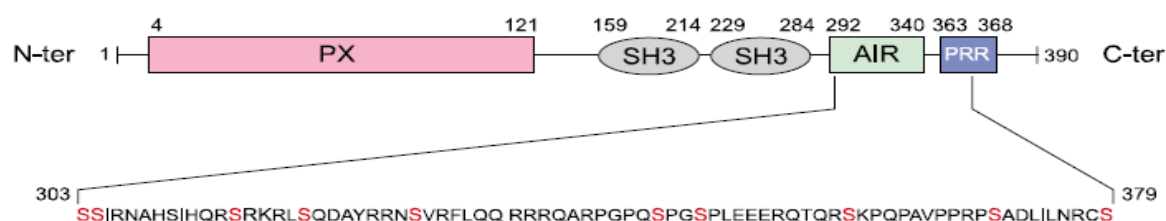
### **V. Phosphorylation des sous unités de la NADPH oxydases**

Bien qu'il existe différents mécanismes moléculaires intervenant dans l'activation de la NADPH oxydase, les mécanismes de phosphorylation des différentes sous-unités jouent un rôle essentiel dans cette activation et nous les décrirons dans les paragraphes suivants.

#### **1. Phosphorylation de la p47phox**

La p47phox est la sous-unité la plus phosphorylée et la plus étudiée. Sa phosphorylation est un processus clé de l'activation de la NADPH oxydase. Elle possède 10 sites de

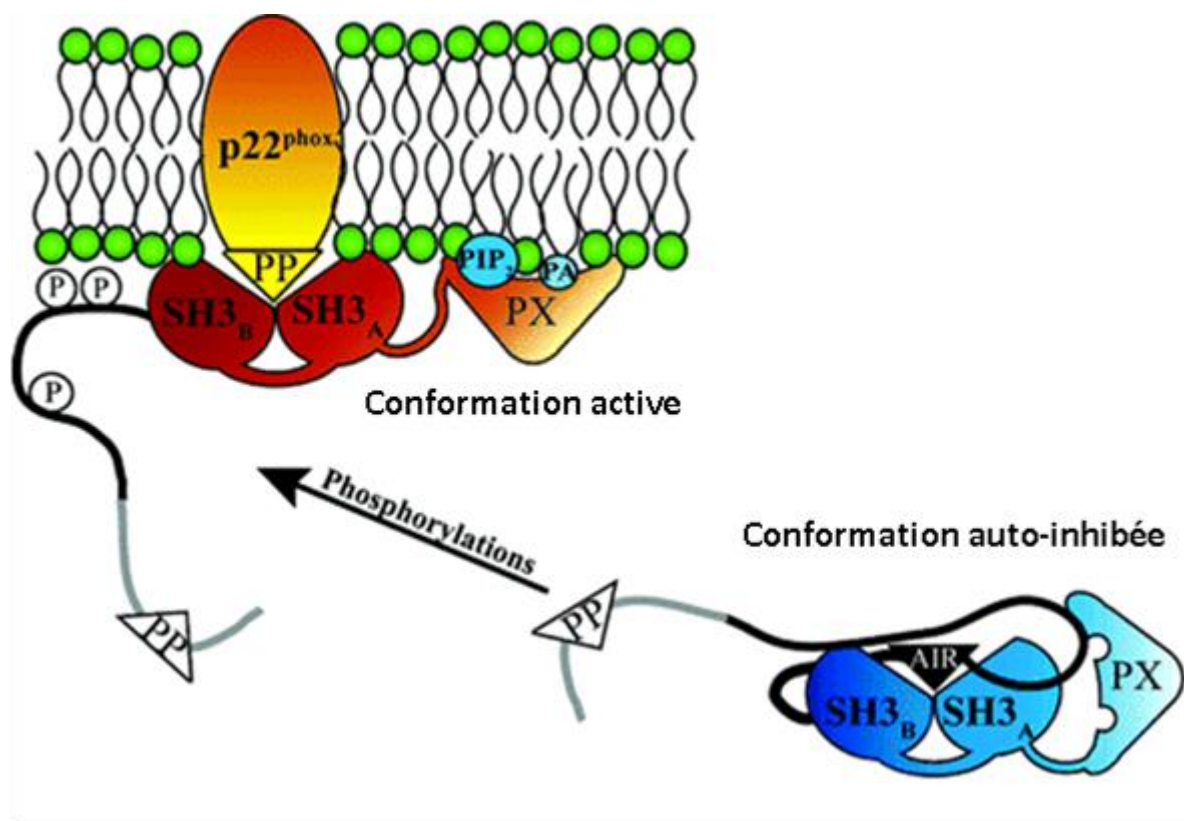
phosphorylation actuellement identifiés, situés dans la région C-terminale dans les domaines AIR et PRR (Figure 17). Au début, survient une phosphorylation primaire de certains résidus sérine, dont les sérines S345, S359, S370 (Johnson et al., 1998), puis des phosphorylations supplémentaires se produisent sur les sérines S303, S304, S315, S320, S328, S348 et S379. Il n'est pas encore clairement établi si toutes ces sérines sont phosphorylées lorsque la protéine est dans le cytosol ou lors de sa migration à la membrane au niveau du cytochrome b558.



**Figure 17: Structure de la p47phox.** Les sites potentiels de phosphorylation dans la région C-terminale sont en rouge. (El Benna et al., 2009)

La phosphorylation de la p47phox est essentielle pour la translocation membranaire du complexe cytosolique (p40phox-p67phox-p47phox) et son interaction avec la p22phox. Au cours de la stimulation du PN, la p47phox subit des événements de phosphorylation, notamment au niveau des sérines localisées dans la région AIR (Sérines 303 à 328) (Figure 17). Cette phosphorylation induit une ouverture de la structure de la p47phox, exposant les domaines SH3 et le domaine PX (Ago et al., 1999 ; Shiose et al., 2000 ; Marcoux et al., 2009) (Figure 18). La p47phox peut alors s'associer à la p22phox et aux phosphatidylinositides membranaires par le domaine PX. La phosphorylation des sérines S359 et S379 dans la région riche en proline «PRR» joue un rôle important dans l'interaction de la p47phox avec la p67phox et par la suite dans la régulation de l'activation de l'oxydase (Mizuki et al., 2005). La substitution des sérines 359 et 370 en alanines diminue fortement la phosphorylation générale de la p47phox, ce qui inhibe sa translocation et la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> par la NADPH oxydase. Ce qui suggère que la phosphorylation de ces deux sérines précède celle des autres résidus sérines de la p47phox (Johnson et al., 1998). Lors de l'activation, la p47phox se phosphoryle d'une façon graduelle. Elle se trouve alors sous différentes formes plus au moins phosphorylées. Concernant la Ser379, localisée dans la zone d'interaction avec p67phox, il a été clairement établi que sa substitution par une alanine provoquait une perte de translocation de p47phox et inhibait son interaction avec la p67phox (Faust et al., 1995; Massenet et al.,

2005; Mizuki et al., 2005). Certains auteurs suggèrent que la phosphorylation de la Ser379 lors de l'explosion oxydative bloquerait l'activité oxydase en entraînant la dissociation de la p67phox (Mizuki et al., 2005).



**Figure 19: Modèle de p47phox dans sa configuration auto-inhibée (au repos) et activée.** Les événements de phosphorylation, levant les interactions intramoléculaires de p47phox, sont schématisés par un P encadré. PP, PA et PIP<sub>2</sub> correspondent, respectivement, à la région PRR, à l'acide phosphatidique et au phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. La région auto-inhibitrice AIR est tracée en noir. (D'après Durand et al., 2006).

Une étude récente de notre équipe a montré qu'au cours du priming la p47phox est phosphorylée sur la sérine 345 présente au sein d'une séquence consensus de reconnaissance pour les MAPK (séquence – PXSP –). Les MAPK p38 et ERK1/2 convergent pour phosphoryler ce résidu en réponse au GM-CSF ou au TNF $\alpha$  (Dang et al., 1999, 2006 a, Dewas et al., 2003). Cette phosphorylation est nécessaire au priming de la NADPH oxydase puisque l'utilisation d'un peptide compétitif inhibiteur ou la mutagenèse dirigée de ce site inhibent le priming induit par le TNF $\alpha$  (Dang et al., 2006 a). Cette phosphorylation provoque une augmentation de la phosphorylation de la p47phox sur d'autres sites lors d'une stimulation ultérieure. Or, un plus haut degré de phosphorylation s'accompagne d'une augmentation de la



translocation et de l'activité NADPH oxydase (Dang et al., 1999 ; Dewas et al., 2003 ; Dang et al., 2006).

La phosphorylation de la Ser345 entraîne le recrutement de la proline isomérase Pin1 dont le rôle est d'induire un changement conformationnel de la p47<sup>phox</sup> qui va faciliter en réponse à un second stimulus sa phosphorylation totale par les PKC et sa translocation vers la membrane (Boussetta et al., 2010) (Figure 19) Le rôle de Pin1 sera décrit ultérieurement.

La p47<sup>phox</sup> peut être phosphorylée par plusieurs kinases dont la PKC, la PAK, AKT, PKA et les MAP kinases (El Benna et al., 1996a). Ainsi, en utilisant plusieurs inhibiteurs de MAP kinases (ERK1/2 et p38MAPK) et des inhibiteurs de PKC, notre équipe a montré que ERK1/2 et p38 peuvent phosphoryler la p47<sup>phox</sup> sur la Ser345, induisant une augmentation de l'activité oxydase (Dang et al., 2006b). La protéine kinase PKA phosphoryle les sérines 320, 328 et/ou 359/370 (El Benna et al., 1996). Notre équipe a montré que les PKCs  $\alpha$ ,  $\beta$ II et  $\delta$  sont impliquées dans la phosphorylation des sérines 303, 304, 315, 320, 328, 359, 370 et 379, la Ser328 étant la plus intensément phosphorylée (El Benna et al., 1996 ; Fontayne et al., 2002). La PKC  $\zeta$  ne peut phosphoryler que les sérines 303/304 et 315. Finalement la kinase Akt ou PKB, activée par la PI3K, peut phosphoryler in vitro la Ser304 et Ser328 (Chen et al., 2003 ; Hoyal et al., 2003). La variation du degré de phosphorylation des sites selon les kinases suggère l'implication d'autres kinases telles que l'effecteur de Rac, PAK (p21-activated kinase) et la caséine kinase II (Park et al., 2001 ; Martyn et al., 2005).

## **2. Phosphorylation de la p67<sup>phox</sup>**

La phosphorylation de la p67<sup>phox</sup> a été décrite pour la première fois par Dusi qui a montré qu'elle est corrélée avec l'activation de la NADPH oxydase (Dusi et al., 1993). Plusieurs travaux ont souligné aussi l'importance de la phosphorylation de la p67<sup>phox</sup> et sa translocation à la membrane dans l'activation de la NADPH oxydase. Les données obtenues par Forbes et collaborateurs montrent que la p67<sup>phox</sup> dans les PN stimulés subit, dans le cytosol, des phosphorylations prédominantes sur des résidus sérine/thréonine, indépendamment de la p47<sup>phox</sup>, suivie après, par sa translocation à la membrane pour s'assembler en complexe actif (Forbes et al., 1999). Cette phosphorylation peut utiliser plusieurs voies de signalisation: elle est intégralement PKC-dépendante avec le PMA mais partiellement PKC indépendante lors d'une stimulation par le fMLF (El Benna et al., 1997).

Le site majeur de phosphorylation de la p67phox est la Thr233 (Forbes et al., 1999) mais la présence d'autres sites a été mise en évidence, notamment au niveau de sérines (El Benna et al., 1997 ; Dang et al., 2003). Notre équipe a montré qu'*in vitro* ERK2 phosphoryle un peptide majeur localisé du côté N-terminal de la p67phox, alors que la p38 MAPkinase phosphoryle un peptide majeur de son côté C-terminal. Pourtant, cette région n'est pas accessible aux MAPKinases dans la p67phox native *in vitro*. En utilisant des inhibiteurs des MAPKinases, l'équipe a montré que ces mêmes kinases sont aussi impliquées dans la phosphorylation de la p67phox dans les PN humains stimulés par le PMA et le fMLP. Ceci suggère qu'après phosphorylation par ERK2, la protéine pourrait changer alors de conformation du côté C-terminal et devenir accessible à une phosphorylation secondaire par la p38 MAPkinase, suivant les étapes d'activation de la NADPH oxydase (Dang et al., 2003).

### **3. Phosphorylation de la p40phox**

Tsunawaki et collaborateurs ont montré que dans les PN, la p40phox régule la production d'anion superoxyde en interagissant via sa partie C-terminal avec la p67phox (Tsunawaki et al., 1996). Dans des cellules HL60 non stimulées, la p40phox possède une phosphorylation basale, et pendant l'activation de la NADPH oxydase elle subit des phosphorylations supplémentaires, corrélées avec la production d'anion superoxyde (Fuchs et al., 1997). La p40phox est phosphorylée sur des résidus sérine et thréonine (Thr154 et Ser315) (Bouin et al., 1998). Ces phosphorylations impliqueraient la PKC pendant l'activation du PN, Ces phosphorylations pourraient inhiber l'interaction intramoléculaire du domaine PX (résidus 24-143) avec le domaine PB1 (résidus 237-329) qui empêchait la liaison de p40phox au PI(3)P dans la membrane phagosome (Ueyama et al., 2007).

### **4. Phosphorylation de la p22phox**

La p22phox subit une phosphorylation sur les résidus thréonines dans les PN humains en réponse à différents stimuli comme le PMA, le zymosan opsonisé et le fMLF. Cette phosphorylation corrèle avec l'activation de la NADPH oxydase (Regier et al., 2000). *In vitro*, la p22phox est le substrat d'une kinase activée par l'acide phosphatidique (kinase PAAK) et le substrat des isoformes conventionnelles de PKC  $\alpha$  et  $\beta$  (Regier et al., 1999). Deux

thréonines sont localisées dans un motif consensus de phosphorylation : Thr132 dans un motif de phosphorylation par la caséine kinase II, et Thr147 dans un motif de phosphorylation par la PKC.

## **5. Phosphorylation de la gp91phox (NOX2)**

Récemment, notre équipe a mis en évidence la phosphorylation de la gp91phox renommée NOX2 dans le PN humain lors d'une activation par le PMA, le fMLF et le Zymosan opsonisé (Raad et al., 2009). Cette phosphorylation de NOX2, qui est médiée par la PKC, favorise l'interaction avec la p47phox, p67phox et Rac2, et améliore l'activité diaphorase. NOX2 est phosphorylée dans sa région cytosolique C-terminale au niveau des séquences 321-405 et 466-570. Ces séquences contiennent trois sites potentiels de phosphorylation par la PKC : Ser333, Thr309 et Ser550.

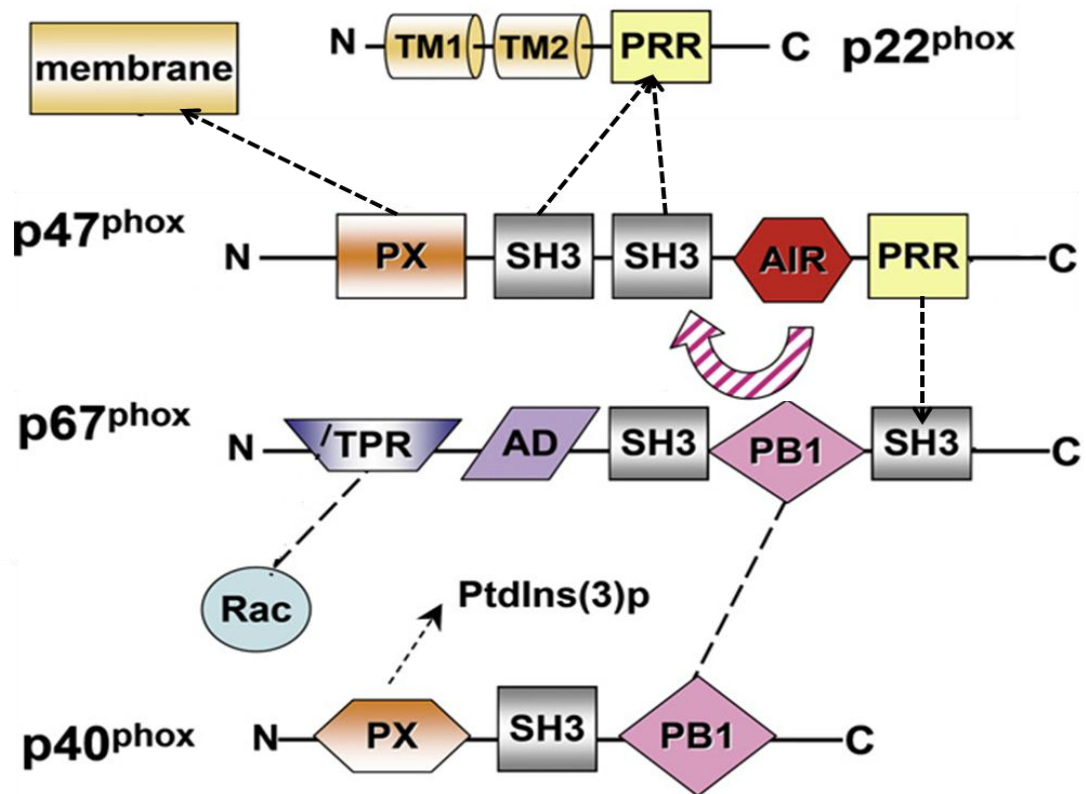
## **6. Activation de rac2**

L'activation du PN induit la dissociation de RhoGDI et la translocation de Rac à la membrane (Quinn et al., 1993 ; Abo et al., 1994). En liant le GTP, rac est convertie sous sa forme active, sous l'action d'une protéine GEF (GDP/GTP exchange factor). Rac va alors s'associer à la p67phox et au cytochrome b558 et permettre l'activation de l'oxydase.

## **VI. Interactions moléculaires des sous-unités de la NADPH oxydase lors de son activation**

Dans les cellules au repos, différentes interactions entre les trois facteurs cytosoliques p47phox, p67phox et p40phox ont été mises en évidence. La combinaison exacte de ces interactions n'est cependant pas totalement établie. Pendant l'activation de l'oxydase, la p47phox est phosphorylée sur plusieurs résidus sérine ; elle change alors de conformation et ses domaines SH3 en tandem se dévoilent pour interagir avec le domaine riche en proline de la p22phox (Huang et al., 1999; Hata et al., 1998; Groemping et al., 2003) ; le domaine SH3 en C-terminal de la p67phox interagit alors à la fois avec la région riche en proline PRR (a.a.

360-369) et une région flanquée en C-terminal de la p47phox (Mizuki et al., 2005). De plus, le domaine PX de la p47phox interagit avec des phospholipides comme les phosphatidylinositols, pour contribuer en partie à l'accrochage de l'enzyme à la membrane plasmique. Le domaine PX n'est accessible aux phosphatidylinositols qu'au moment de l'activation; il assure un rôle crucial dans l'assemblage de la NADPH oxydase au niveau de la membrane (Ago et al., 2003). En plus de ces interactions, De Leo et collaborateurs ont montré par la technique de «phage display» la présence de deux régions d'interaction entre la p47phox et la p67phox, qui sont : les résidus 323-332 et les résidus 361-370 du domaine SH3 de la p47phox comme sites d'interaction de la p47phox avec la p67phox (De Leo et al., 1996). Il a été montré que cette même région (323-332) est un site d'interaction avec le flavocytochrome b (De Leo et al., 1995). De plus, en utilisant les techniques d'interaction par affinité, ils ont montré que la p67phox et le cytochrome b558 entrent en compétition pour interagir avec cette région, ce qui suggère qu'il y a une sorte d'échange d'interaction entre les deux protéines pour cette même région en fonction des étapes d'activation de la NADPH oxydase et que cette région assure un rôle important dans la régulation des interactions entre les deux protéines. De plus, un domaine situé dans la région N-terminale de la p67phox dit «domaine d'activation» (a.a. 199-210) interagit avec le cytochrome b558 pour réguler l'étape 1 du transfert d'électrons (du NADPH au FAD) (Nisimoto et al., 1998). Ensuite les motifs TRR de la p67phox s'engagent en une interaction avec Rac-GTP (Koga et al., 1999).



*Figure 20: Représentation schématique des interactions possibles entre les facteurs cytosoliques p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> et p40<sup>phox</sup> (d'après Krause et al., 2007).*

## VII. Désensibilisation de la production des FRO par les PN

La régulation de la NADPH oxydase implique une désactivation du système afin d'aboutir à la résolution du phénomène inflammatoire. Il faut donc un système de régulation stricte de la NADPH oxydase. Les phénomènes de désensibilisation font appel à différents mécanismes: internalisation des récepteurs, dégradation de certains récepteurs comme ceux du TNF $\alpha$ , phosphorylation des récepteurs à sept domaines transmembranaires suivie d'un découplage des signaux transductionnels par l'arrestine ou encore par l'intervention de protéines RGS (regulatory G protein signaling) à activité GTPase (Ferguson et al., 2001). Une élévation de la concentration intracellulaire de l'AMPc ainsi que l'intervention de la Protéine Kinase A inhibent la phosphorylation de la p47<sup>phox</sup> et l'activation de l'oxydase en réponse au fMLF (Bengis-Garber et al., 1996). Par ailleurs, la transduction du signal fait intervenir des phénomènes de phosphorylation, eux-mêmes régulés par des phénomènes de

déphosphorylation. Ainsi de nombreuses phosphatases existent dans le PN (CD45, Protéine Phosphatases 1 et 2A) qui permettent une déphosphorylation des composants du système conduisant ainsi à l'arrêt de son activité. Cependant, un autre mécanisme d'arrêt de l'activation de la NADPH oxydase a été suggéré: l'arrêt de l'activité oxydasique serait corrélé avec une perte du complexe p47phox/p67phox accroché au cytochrome b558 à la suite d'une hyperphosphorylation de la p47phox (Yamaguchi et al., 1995, DeLeo et al., 1999).

## **VIII. Les pathologies associées à une dérégulation de la NADPH oxydase**

Les FRO étant impliquées dans divers mécanismes physiopathologiques, la NADPH oxydase phagocytaire et ses homologues ont été associés à de nombreuses maladies inflammatoires chroniques, autoimmunes et cardiovasculaires. Ainsi, dans la polyarthrite rhumatoïde, une activation excessive de la NOX2 participe au maintien de l'inflammation et aux dommages tissulaires. Dans l'hypertension et l'athérosclérose, une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase est retrouvée au niveau endothélial.

### **1. La polyarthrite rhumatoïde (PR)**

Les FRO participent à la physiopathologie de différentes maladies inflammatoires auto-immunes. Nous prendrons comme exemple la polyarthrite rhumatoïde. La polyarthrite rhumatoïde (PR) est la maladie rhumatismale inflammatoire la plus fréquente (0,5-1 % de la population adulte). C'est une maladie autoimmune systémique dont le caractère inflammatoire s'exprime particulièrement au niveau des articulations. Le volume du liquide synovial est augmenté avec une infiltration de différents types cellulaires dont 80 % de PN. Dans les PN isolés à partir du liquide synovial de patients atteints de PR, l'activité de la NADPH oxydase est augmentée (Eggleton et al., 1995, El Benna et al., 2002). La production excessive et inappropriée de FRO est due à la présence massive de phagocytes infiltrés et de cytokines primantes (TNF $\alpha$ , IL-8) dans le liquide synovial. Les FRO participent par différents mécanismes à la destruction du cartilage, à l'érosion des ostéo-articulaire. Ils induisent des dommages directs des molécules de la matrice extracellulaire tels que les collagènes et les protéoglycanes (Burkhardt et al., 1986). Les FRO clivent également des proenzymes en enzymes actives telles que l'élastase et des métalloprotéases (Shabani et al., 1998). Chez

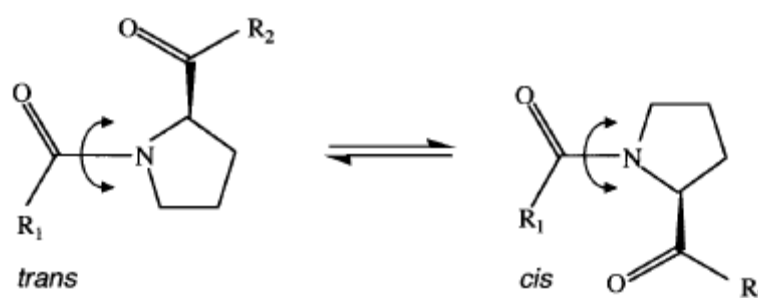
l'homme et dans des modèles expérimentaux d'arthrite, il a été montré que les dommages oxydatifs participent à l'activation autoimmune contre de nouveaux épitopes (Hitchon et al., 2004). Le rôle délétère des FRO dans la PR est conforté par des modèles animaux de polyarthrite où l'injection de l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase réduit significativement la sévérité de la maladie (Kakimoto et al., 1993).

## **2. La Granulomatose septique chronique**

Des mutations dans l'un des gènes des principales protéines de la NADPH oxydase (gp91phox/NOX2, p22phox, p47phox, p67phox et Rac2) peuvent conduire à un déficit immunitaire sévère appelé la granulomatose septique chronique ou chronic granulomatous disease (CGD) (Roos et al., 1996). Il s'agit d'une maladie génétique dans laquelle les phagocytes ne produisent pas de FRO. La CGD est caractérisée par des infections bactériennes et fongiques graves et récidivantes. Les formes les plus répandues (2/3 des cas) sont liées à des mutations dans le gène CYBB codant pour NOX2 (Teahan et al., 1987; Dinanuer et al., 1987; Roos et al., 1996). Ce gène se trouve sur le chromosome X. De telles mutations entraînent le plus souvent l'absence du cytochrome b558 (Segal et al., 1987) ; en effet, NOX2 et la p22phox sont coexprimées et l'absence de NOX2 est accompagnée de l'absence de la p22phox et vice versa. Certaines formes de CGD liée à l'X expriment NOX2 qui est non fonctionnelle (Cross et al., 1995b). Les autres formes connues de CGD sont autosomales récessives et résultent de l'absence de la p47phox (25% des cas), de la p67phox (<5% des cas) ou de la p22 phox (<5% des cas) (Volpp et al., 1988; Nuno et al., 1988). Récemment, un déficit en p40phox a été décrit. Le diagnostic de la CGD repose sur l'incapacité des PN du patient à produire des FRO en réponse à différents stimuli. La caractérisation de ces mutations et l'étude des dysfonctionnements qu'elles provoquent dans l'assemblage du complexe ou dans son activation apportent des données complémentaires aux études *in vitro* dans la compréhension des mécanismes de régulation de ce système de transfert d'électrons.

## D. GENERALITES SUR LES PEPTIDYL-PROLYLE CIS/TRANS ISOMERASE

Les peptidyl-prolyl cis/trans isomérases (PPIases), aussi appelées rotamases sont une famille d'enzymes capables de catalyser l'isomérisation des liaisons peptidiques entre un acide aminé X et une proline (Figure 21). En effet, cette liaison se retrouve majoritairement en conformation cis à la différence des autres liaisons. L'absence de proton sur la fonction amine du résidu proline empêche la formation des structures secondaires comme les hélices  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$  (Galat et al., 1995). Le passage à la conformation trans constitue un événement moléculaire essentiel au repliement des protéines.



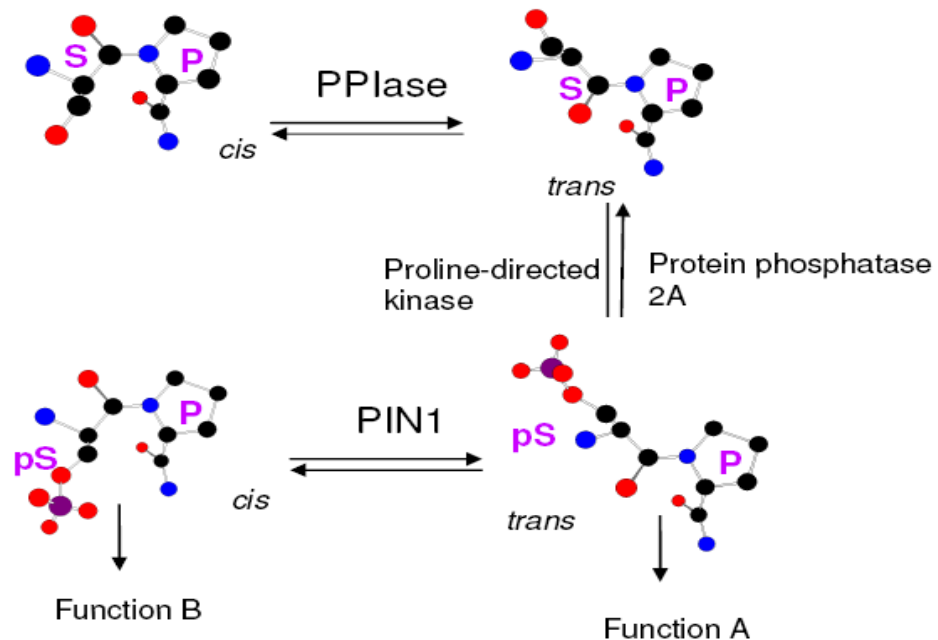
*Figure 21: Isomérisation cis-trans d'un lien peptidyl-prolyl (Göthel et al., 1999)*

Dans la cellule, les PPIases sont impliquées dans le repliement des protéines et jouent un rôle de chaperones moléculaires comme les protéines de choc thermique et les disulfures isomérases qui catalysent la formation et la rupture des ponts disulfures, permettant aux protéines d'acquies leur structure tridimensionnelle correcte dont dépendra leur activité.

Les PPIases ont été divisées en trois sous-familles selon leur spécificité pour un ligand: les cyclophilines, les FKBP (FK506-binding proteins) et les parvulines. Les trois sous-familles de PPIases ne partagent aucune ressemblance au niveau de leur structure tridimensionnelle et se distinguent par leur ligand respectif. Les cyclophilines tirent leur nom de l'affinité qu'elles possèdent pour la cyclosporine A, et les FKBP ont une forte affinité pour la molécule FK506, un autre immunosuppresseur. Enfin, les parvulines tirent leur nom du prototype de cette troisième sous-famille de PPIases, la parvuline isolée chez *E. coli* (Rahfeld et al., 1994). Chez l'homme, des protéines homologues à la parvuline d'*E. coli* ont également été isolées. Pin1 (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1) fait partie de cette



sous-famille et est la seule proline isomérase qui agit sur une liaison peptidique de type proline qui est précédée par une sérine ou thréonine phosphorylée (Figure 22).



**Figure 22:** *Changement de conformation des motifs Ser/Thr-Pro et p-Ser/Thr-Pro catalysé par les PPIases.*

## I. La proline isomérase Pin1

Pin1 (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1) est une protéine de 163 acides aminés (18 kDa). Elle a été identifiée en 1996. Elle possède deux domaines distincts reliés par une région charnière flexible.

L'implication de Pin1 dans le déroulement du cycle cellulaire a été mise en évidence par l'observation selon laquelle des cellules HeLa exprimant l'ARN antisens de Pin1 présentent des phénotypes mitotiques précoces (condensation des chromosomes, fragmentation de la membrane nucléaire, formation du fuseau mitotique), mais ne peuvent plus sortir de mitose et meurent inéluctablement par apoptose. À l'inverse, les cellules surexprimant Pin1 sont bloquées à la transition G2/M (Lu et al., 1996).

## 1. Structure de Pin1

Pin1 possède deux domaines distincts reliés par une région charnière flexible: un domaine amino-terminal de type WW et un domaine carboxy-terminal porteur de l'activité peptidyl-prolyl isomérase (Figure 23)



**Figure 23: Structure de Pin1.** Pin1 est une protéine de 163 acides aminés possédant deux domaines reliés entre eux par une région charnière flexible et non structurée. Le domaine WW à l'extrémité amino-terminale de la protéine renferme deux résidus tryptophane conservés, indispensables à la fixation de Pin1 à ses substrats. Le domaine PPlase est situé à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine.

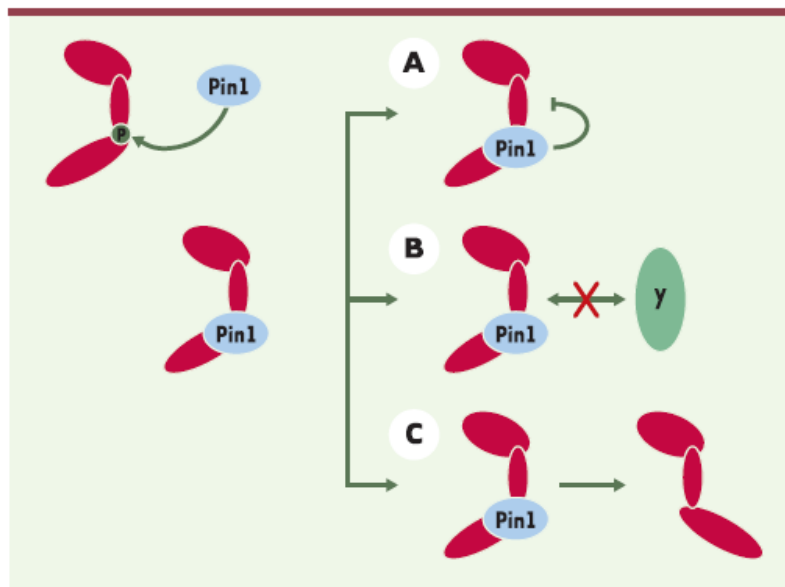
Les domaines WW sont des petits modules de 38-40 acides aminés caractérisés par un pourcentage élevé de résidus hydrophobes et aromatiques, notamment deux tryptophanes conservés séparés de 20 ou 22 résidus, un ensemble de deux ou trois résidus aromatiques localisés entre les deux tryptophanes (Verdecia et al., 2000). Le domaine WW de Pin1 est responsable de la liaison aux substrats contenant des sérines ou des thréonines phosphorylées suivies d'une proline, et en particulier de la liaison à des phosphoprotéines impliquées dans la mitose (Lu et al., 1999).

## 2. Fonction de pin1

Pin1, en se liant de manière spécifique aux protéines phosphorylées au niveau de sites suivis d'un résidu Pro, catalyse un changement conformationnel consécutif au processus de phosphorylation (Lu et al., 2000). Cette fonction régule l'activité catalytique de la protéine substrat, sa déphosphorylation, sa localisation cellulaire, ou encore les interactions avec ses autres partenaires. Ce mode d'interaction a été proposé comme un second facteur de régulation de la fonction des protéines en ajoutant un autre acteur au face à face kinases/phosphatases, incluant ainsi un degré de variabilité supplémentaire dans la fonction gouvernant la dynamique du cycle cellulaire. Pin1 pourrait, en quelque sorte, être nécessaire pour prévenir une activation mitotique mal contrôlée. Cependant, sa fonction biologique semble bien plus complexe puisque Pin1 est essentielle pour la croissance cellulaire et la

différenciation (Lu et al., 1996) alors que chez la levure, les cyclophilines et les FKBP peuvent être complètement inactivées sans induire la mort cellulaire.

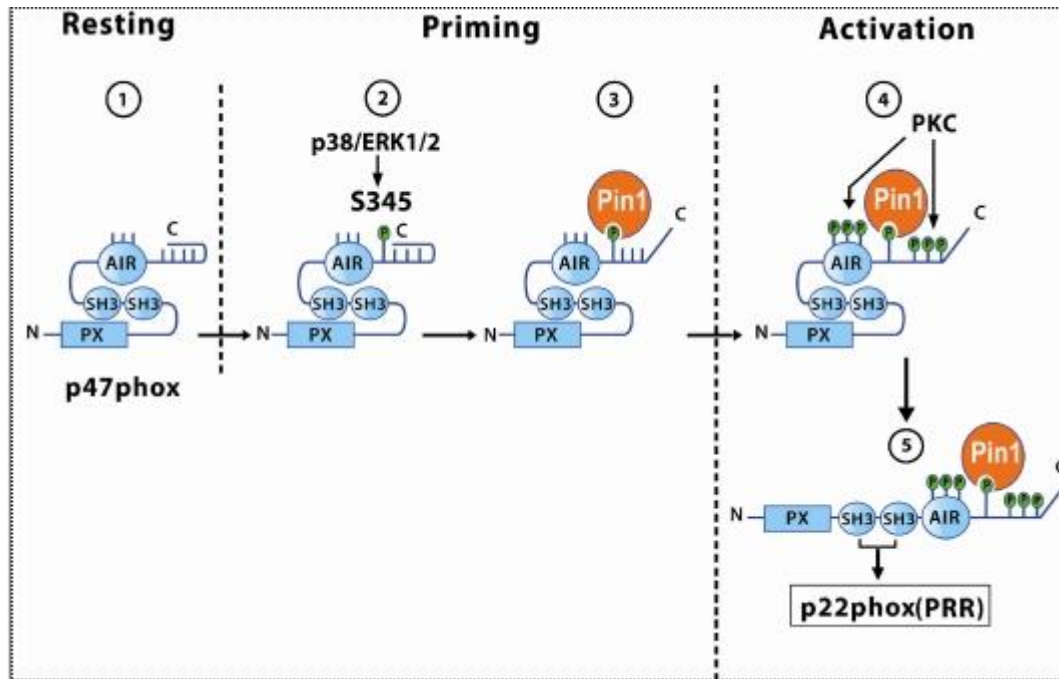
En dehors de son activité prolyl isomérase, Pin1 peut moduler l'activité de certaines protéines par la liaison de son domaine WW sur ces protéines, sans catalyser une isomérisation. Cette association simple contribuerait à masquer certains sites sur ces protéines et ainsi à moduler leur activité ou leur liaison à d'autres partenaires (Figure 24) (Patra et al., 1999). Par exemple, la simple liaison de Pin1 à NFAT, un facteur de transcription, inhibe sa déphosphorylation par la calcineurine en bloquant son accès à NFAT (Liu et al., 2001).



**Figure 24: Effets potentiels de la peptidyl-prolyl isomérase Pin1 sur ses protéines cibles.** A. La liaison de Pin1 à la protéine inhibe son activité. B. La liaison de Pin1 à la protéine empêche la liaison de celle-ci à une autre protéine. C. Un changement structural provoqué par Pin1 peut augmenter ou diminuer l'activité de la protéine, permettre ou inhiber sa liaison à d'autres protéines.

Des travaux antérieurs de notre équipe montrent que la Ser345 est un site de convergence de différentes MAPK, permettant ainsi une potentialisation de la production des FRO par les PN pendant les réactions inflammatoires. Cette préphosphorylation par les MAPK pourrait induire un changement de conformation de la protéine et une accessibilité plus facile des autres kinases complétant la phosphorylation, et permettrait une translocation plus rapide à la

membrane des protéines cytosoliques. La Ser345 est présente au sein d'une séquence riche en prolines (-PGPQSPGSP-). Les peptides qui contiennent les résidues prolines existent soit en conformation cis ou trans. La conversion des conformations cis-trans est catalysée par la famille peptidyl-prolyl isomerase (PPI) qui sont la cyclophiline A, la FKBP (FK506 binding protein), et Pin1 (Protein Interacting with NIMA-kinase). Le changement de conformation « cis-trans » régule les fonctions et les propriétés des protéines comme l'interaction protéine-protéine, la localisation subcellulaire, la stabilité...Pin1 est la seule proline isomérase qui se lie et agit sur une séquence phosphorylée de type phospho-Ser/Thr-Pro comme celle de la Ser345 de la p47phox phosphorylée pendant le priming. La phosphorylation de la ser345 induit la liaison de la proline isomérase Pin1 qui changerait la conformation de la région carboxy-terminale de la p47phox pour la rendre plus accessible à une phosphorylation secondaire par les PKC ou par d'autres kinases. Le rôle de de Pin1 dans l'hyperactivation de la NADPH oxydase induite par le TNF $\alpha$  et le GM-CSF a été étudié (figure 25) (Boussetta et al., 2010). Cette étude a montré que la préphosphorylation de la p47 phox au niveau de la serine 345 induit un changement de conformation de la protéine et une accessibilité plus facile des autres kinases complétant la phosphorylation, et permet une translocation plus rapide à la membrane. Ce site phosphorylé de la p47phox est en grande partie responsable du « priming » exercé par le TNF $\alpha$  et le GM-CSF sur la NADPH oxydase phagocytaire et donc de la production des FRO, source de lésions tissulaires dans les maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde. L'identification précise des mécanismes moléculaires conduisant au priming au sein d'un site inflammatoire pourrait représenter une cible thérapeutique de première importance dans la modulation des réponses inflammatoires pathologiques.



**Figure 25: Model de différentes conformations de la p47phox dans les neutrophils au repos, primés, et activés: rôle de Pin1 et phosphorylation.** Dans les cellules au repos, la p47phox n'est pas phosphorylée. (1) Durant le priming, la p47phox est d'abord phosphorylée par les MAPKinase (ERK1/2 ou p38MAPK) au niveau de la Ser345, (2) Pin1 activée se fixe sur ce site phosphorylé, (3) induisant le premier changement conformationnel de la p47phox permettant aux isoformes des PKC de phosphoryler d'autres sites durant l'activation. (4) La phosphorylation de la p47phox au niveau de ces sites empêche l'interaction des deux domaines SH3/AIR, favorisant la liaison du domaine SH3 avec le domaine proline-rich region (PRR) de la p22phox (5) et l'hyperactivation NADPH oxydase. (Boussetta T et al., 2010).

### 3. Régulation de Pin1

D'une façon tout à fait intéressante, l'interaction du domaine WW ne semble pas seulement être régulée par la phosphorylation de son substrat, mais également par la phosphorylation du domaine WW lui-même (Lu et al., 2002). La phosphorylation du domaine WW au niveau du résidu Ser16 inactive Pin1 en inhibant sa capacité de liaison à ses substrats et joue ainsi un rôle dans sa localisation subcellulaire dans les cellules Hela (Lu et al., 2002). Alors que Pin1 est essentiellement localisée dans le noyau, Pin1 phosphorylée a une distribution cellulaire plus diffuse dans l'ensemble des compartiments (Lu et al., 2002).

## **TRAVAUX DE RECHERCHE**

## OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Les polynucléaires neutrophiles (PN) sont les cellules clés de l'immunité et de l'inflammation. Pendant leur activation ces cellules produisent de grandes quantités de formes réactives de l'oxygène (FRO) par un système enzymatique appelé la NADPH oxydase. Dans les maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde (PR), l'activation de la NADPH oxydase et la production des FRO est augmentée car les cellules sont en contact avec des cytokines proinflammatoires comme le TNF $\alpha$  et le GM-CSF. Ces cytokines augmentent l'activation de la NADPH oxydase en phosphorylant un site spécifique de la p47phox, un composant cytosolique activateur de l'enzyme.

Les TLR (Toll Like Receptor) (TLR1 à 10) sont des récepteurs exprimés à la surface de nombreuses cellules dont les cellules immunitaires, ils sont capables de détecter des agonistes spécifiques comme les motifs exprimés par les agents pathogènes, des protéines modifiées reconnues comme étrangères et des lipides oxydés. Certains de ces agonistes induisent un priming de production des FRO mais les mécanismes impliqués ne sont pas connus. **Le but de travail de thèse était d'étudier l'effet des agonistes des TLR sur la production des FRO par les neutrophiles humains et d'analyser les mécanismes qui contrôlent cet effet.**

**Mon travail a consisté dans un premier temps à étudier l'effet du CL097 agoniste des TLR7/8 sur la production des FRO par les polynucléaires neutrophiles humains. Mes résultats ont montré que l'agoniste des TLR7/8, le CL097 augmente fortement la production des FRO par les PN stimulés par le fMLF. Cet effet est contrôlé par la phosphorylation de la p47phox (par les MAPK et les PKC) et par la proline isomérase Pin1. Ce travail a fait l'objet d'un premier article qui a été soumis au Journal of immunology sous le titre The TLR 7/8 agonist CL097 primes fMLF-stimulated NADPH oxidase activation in human neutrophils: Critical role of p47phox-phosphorylation and the proline isomerase Pin1.**

Dans un deuxième temps, et pour mieux comprendre la participation de chacun des TLR7 ou 8 dans le priming de la NADPH oxydase, nous avons testé l'effet du CL075 (agoniste spécifique du TLR8) et la Loxoribine (agoniste spécifique du TLR7) sur la production des FRO. Les résultats montrent que le CL075 induit un priming de la production des FRO par les PN comparable à celui induit par le CL097, alors que la Loxoribine n'a pas d'effet. Ces résultats supplémentaires suggèrent que l'effet de CL097 dépend des voies de signalisations engagées par TLR8 mais pas par TLR7.

Dans une dernière étude nous avons étudié l'effet du Zymosan non opsonisé (agoniste de TLR2) sur l'activation de la NADPH oxydase. Nous avons montré que cet agoniste seul, induit une forte production des FRO par les neutrophiles en induisant la phosphorylation de la p47phox au niveau des Ser-345, Ser-315 et Ser-328. Ces phosphorylations font intervenir respectivement les MAPK ERK1/2 et p38, une protéine tyrosine kinase et les PKC. Cette étude montre aussi que le Zymosan active la petite protéine cytosolique Rac2, nécessaire à l'activation de la NADPH oxydase. Ce travail a été soumis pour publication sous le titre *Zymosan a cell-wall preparation from Saccharomyces cerevisiae induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2.*



## **Article 1**

**Article 1 : Le CL097, un agonist des TLR 7/8, induit une augmentation de l'activation de la NADPH oxydase stimulée par le fMLF dans les neutrophiles humains: Rôle critique de la phosphorylation de la p47phox et de la proline isomerase Pin1**

Les TLR 7 et 8 sont des récepteurs exprimés à la surface des cellules immunitaires, ils sont capables de détecter et de reconnaître des séquences d'ARN simple brin et des molécules synthétiques de la famille des imidazoquinoline. Les TLR 7 et 8 jouent un rôle majeur dans la défense anti-virale et les dérivés des imidazoquinoline sont à l'heure actuelle développés comme une nouvelle famille d'antiviraux. Cependant l'effet des agonistes des TLR7/8 sur la production des FRO par les polynucléaires neutrophiles n'est pas connu. Le but de cet article est d'étudier l'effet du CL097 (Imidazoquinoline) sur la production des formes réactives de l'oxygène (FRO) par le PN. Les résultats montrent que le CL097, un agoniste des TLR7/8, n'induisait pas, seul, la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> par le PN mais potentialisait fortement la production de FRO par les PN stimulés secondairement par un peptide bactérien le fMLF. Nous avons donc décidé d'explorer les mécanismes impliqués dans ce priming de la production des FRO au niveau moléculaire. En utilisant des anticorps spécifiques des différents sites phosphorylés produits par notre laboratoire, nous avons montré que le CL097 induit la phosphorylation de la p47phox au niveau de la Ser345, et de deux autres sites (Ser328, Ser315). Nos résultats ont montré une augmentation importante de la phosphorylation des sérines 328 et 315 dans les PN traités par le CL097 et stimulés par le fMLF, tandis que le niveau de phosphorylation de la sérine 345 restait inchangé. La phosphorylation des sites 315 et 328 est donc primée par le CL097. Nous avons ensuite montré que le CL097 induisait la phosphorylation des MAPkinases (ERK1/2 et p38) et des PKC. Puis en utilisant des inhibiteurs de ces kinases, nous avons montré que le CL097 engageait la voie des MAP-Kinases (p38 et ERK1/2) pour induire la phosphorylation de la S345 de la p47phox, alors que le CL097 engageait les PKC dans la phosphorylation de la S328 de la p47phox. La genistéine, un inhibiteur des protéines tyrosines kinases, inhibe la phosphorylation des trois serines (S345 et S328). Etant donné que la S3345 phosphorylée est un site de liaison de la proline isomérase Pin1, nous avons montré que le CL097 active Pin1 dans les PN et l'inhibition de Pin1 inhibe l'effet primant de CL097. En conclusion les recepteurs TLR7/8 augmentent la production des FRO par les PN en augmentant la phosphorylation de la p47phox et en activant Pin.

***Article 1 : Karama Makni-Maalej, Tarek Boussetta, Margarita Hurtado-Nedelec, Sahra Amel Belambri, Marie-Anne Gougerot-Pocidalo, and Jamel El-Benna. The TLR 7/8 agonist CL097 primes fMLF-stimulated NADPH oxidase activation in human neutrophils: Critical role of p47phox-phosphorylation and the proline isomerase Pin1 (en révision).***

**The TLR 7/8 agonist CL097 primes fMLF-stimulated NADPH oxidase activation in human neutrophils: Critical role of p47phox-phosphorylation and the proline isomerase Pin1**

**Running title:** TLR 7/8 agonist primes neutrophil-ROS production

**Karama Makni-Maalej\*†, Tarek Boussetta\*†, Margarita Hurtado-Nedelec\*†‡, Sahra Amel Belambri\*†, Marie-Anne Gougerot-Pocidalo\*†‡, and Jamel El-Benna\*†**

\*INSERM, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon CRB3, Paris F-75018, France. †Université Paris 7 site Bichat, UMRS 773, Paris F-75018, France. ‡AP-HP, Centre Hospitalier Universitaire Xavier Bichat, UF Dysfonctionnements Immunitaires, Paris, F-75018.

T.B. and M.H-N. contributed equally to this work.

This work was supported by INSERM, CNRS and DGRST.

Corresponding author: Dr. Jamel El-Benna, INSERM, U773, CRB3, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, Paris F-75018, France. Tél: 33 1 57 27 77 23, Email: jamel.elbenna@inserm.fr

Abbreviations: phox: phagocyte oxidase; Pin1: proline isomerase 1; PKC: protein kinase C; ROS: reactive oxygen species; Ser: serine.

## Abstract

Superoxide anion production by the neutrophil NADPH oxidase plays a key role in host defense; however, excessive superoxide production is believed to participate to inflammatory reactions. Neutrophils express several TLR that recognize a variety of microbial motifs or agonists. The interaction between TLR and their agonists is believed to help neutrophils to recognize and to eliminate the pathogen. However, the effects of some TLR agonists on the NADPH oxidase activation and the mechanisms controlling these effects have not been elucidated. In this study, we show that the TLR7/8 agonist CL097 by itself did not induce NADPH oxidase activation in human neutrophils, but induced a dramatic increase of fMLF-stimulated activation. Interestingly, CL097 induced cytochrome b558 translocation to the plasma membrane and the phosphorylation of the NADPH oxidase cytosolic component p47phox on Ser345, Ser328 and Ser315. Phosphorylations of Ser328 and Ser315 were significantly increased in CL097-primed and fMLF-stimulated neutrophils. Phosphorylation of Ser345, Ser328 and Ser315 was decreased by inhibitors of p38MAPK and the ERK1/2-pathway. Phosphorylation of Ser328 was decreased by a PKC inhibitor. Genistein, a broad range protein tyrosine kinase inhibitor, inhibited the phosphorylation of these serines. Our results also show that CL097 induced proline isomerase (Pin1) activation and that juglone, a Pin1 inhibitor, inhibited CL097-mediated priming of fMLF-induced p47phox phosphorylation and superoxide production. These results show that activation of TLR7/8 in human neutrophils induces hyper-activation of the NADPH oxidase by stimulating the phosphorylation of p47phox on selective sites, and suggest that p38MAPK, ERK1/2, PKC and Pin1 control this process.

## Introduction

Polymorphonuclear neutrophils (neutrophils), the most abundant circulating leukocytes are essential for host defense against pathogens (1). Upon infection, neutrophils migrate towards the infection site attracted by chemoattractants such as the complement fraction C5a, the N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF) peptide, interleukin 8 (IL-8), platelet activating factor (PAF) or leukotriene B4 (LTB4) (2). Once at the infection site, neutrophils recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), via pattern recognition receptors such as toll-like receptors (TLR), which are transmembrane receptors that play an important role in innate immune recognition of pathogens (3, 4). Neutrophils will then rapidly phagocytose the antibody- and complement-opsonized pathogen. Phagocytosis is accompanied by neutrophil activation, resulting in the release of proteolytic enzymes and antimicrobial peptides, and the massive production of reactive oxygen species (ROS) (5).

The TLR family of receptors is composed of up to 10 members in humans (TLR1-10) and 12 in mice (6). TLR have a common structure with an extracellular recognition domain and an intracellular TIR (Toll/IL-1 receptor) domain (4). Human neutrophils express all TLR except TLR3 (7). TLR recognize a variety of pathogen-derived agents and molecules such as triacyl lipopeptides, peptidoglycans, zymosan, lipoteichoic acid, LPS, flagellin and demethylated CpG motifs of single stranded DNA (8-12). TLR7 and 8 are located in the intracellular endosomal compartment where they recognize single stranded RNA and imidazoquinolones (6, 13). Upon activation, TLR1, 2 and 6 recruit two adaptor proteins, TIRAP and MyD88, TLR4 recruits TIRAP, MyD88, TRAM and TRIF, whereas TLR5, 7, 8 and 9 recruit only MyD88 (3, 4). These recruitments lead to activation of the IRAK kinase and that of downstream protein kinases, which control specific cellular functions such as cytokine production (14) and inhibition of apoptosis (15).

Neutrophil ROS production is controlled by the NADPH oxidase enzyme complex (also called NOX2) (16, 17). This multi-component enzyme is dormant in resting cells and can be activated by various stimuli (18). In the activated form, the NADPH oxidase complex mediates the transfer of electrons from cytosolic NADPH to oxygen to produce superoxide anion (16). Superoxide is the precursor of other toxic ROS, such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and hypochlorous acid (HOCl), which are involved in microbial killing (19). The NADPH oxidase consists of a membrane bound flavocytochrome b558 (composed of p22phox and gp91phox/NOX2) and four cytosolic subunits: p47phox, p67phox, p40phox, and Rac1/2 (20, 21). Activation of the NADPH oxidase is initiated by p47phox phosphorylation and its migration with that of the other cytosolic components to the membrane where they associate with the membrane bound components to assemble the catalytically active oxidase (20). Agonists such as the bacterial peptide fMLF and the pharmacological PKC activator PMA at micromolar concentrations strongly induce p47phox phosphorylation on several serines and NADPH oxidase activation (20). Proinflammatory agents such as cytokines (GM-CSF, TNF $\alpha$  and IL-8) alone induce a very weak oxidative response by neutrophils but strongly enhance ROS release upon exposure to a secondary stimulus such as fMLF (18). This priming effect at the infection site could facilitate the rapid elimination of the pathogen;

however, excessive and uncontrolled priming could participate to the inflammatory reaction and thus be self-destructive (22, 23). The priming effect has been shown to be controlled by the partial phosphorylation of p47phox (24-26), the activation of the proline isomerase Pin1 (27) and the translocation of the flavocytochrome b588 to the plasma membranes (28, 29).

Among the TLR agonists, LPS and zymosan have been described to exert a priming effect on fMLF-induced ROS production (18). However, the effect of CL097, a TLR7/8 agonist, on the neutrophil ROS production and its activation pathways are unknown. In this study, we show that CL097 acts as a priming agent of the neutrophil ROS production. CL097 induced p47phox phosphorylation on specific sites and activation of Pin1, which could play a critical role in this priming effect. The (TLR7/8-p47phox-Pin1)-axis could be targeted to limit excessive ROS production at inflammatory sites.

## **Materials and Methods**

### **Reagents**

CL097 and other TLR agonists were from InvivoGen (San Diego, CA, USA). PMA, fMLF, cytochrome c, protein kinase inhibitors, protease and phosphatase inhibitors, endotoxin-free buffers and salt solutions were from Sigma Chemical Co (Saint Louis, MO, USA). SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) and Western blotting reagents were purchased from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Polyclonal anti-TLR7 and anti-TLR8 antibodies were from Abcam (Cambridge, UK ). The rabbit polyclonal antibodies against phospho-sites p47phox and p47phox have been described elsewhere (27).

### **Neutrophil and monocyte preparation**

Circulating neutrophils were isolated from healthy volunteers by Polymorphprep™ (Axis Shield, Dundee, Scotland) gradient centrifugation (26, 27). The neutrophil band was collected and the cells were washed in PBS and counted. Neutrophils were 96% pure and 99% viable. Monocytes were purified by a Ficoll gradient centrifugation and depletion of lymphocytes by the Untouched Monocytes isolation Kit following the corresponding instructions (Milteny, Invitrogen, France).

### **Superoxide anion production assay**

Neutrophils were treated with CL097 at 37°C for 30 min in HBSS. Thereafter, extracellular superoxide production was measured in response to fMLF (10<sup>-7</sup> M, 10 min) by the superoxide dismutase-inhibitable ferricytochrome c reduction assay (24, 25).

Intracellular superoxide anion production was measured with a flow cytometric assay using hydroethidine (HE) as previously described (15): HE diffuses into cells and, during the neutrophil oxidative burst, non fluorescent intracellular HE is oxidized by superoxide anion to highly fluorescent ethidium that is trapped in the nucleus by intercalation into DNA. Whole blood samples (500  $\mu$ l) were loaded for 15 min with HE (1.5  $\mu$ g/ml) at 37°C and then incubated with PBS, CLO97 (5  $\mu$ g/ml) or TNF $\alpha$  (20 ng/ml) for 30min. TNF $\alpha$  was used as a positive control; samples were then treated with PBS or 10<sup>-7</sup> M fMLF for 5 min. Red blood cells were lysed and after one wash, white blood cells were resuspended in 1% paraformaldehyde-PBS and immediately analyzed by flow cytometry as described below.

### **Measurement of ROS production by luminol-amplified chemiluminescence**

Neutrophils (5 x 10<sup>5</sup>) were suspended in 0.5 ml HBSS containing 10  $\mu$ M luminol at 37°C with or without different concentrations of CL097 for 30 min. TNF $\alpha$  (20 ng/ml), then the cells were stimulated with 10<sup>-7</sup> M fMLF. Chemiluminescence was recorded with a luminometer (Berthold-Biolumat LB937).

### **Determination of CD11b-Positive Cells and 7D5-Positive Cells at the neutrophil surface**

Whole-blood samples (500  $\mu$ L) from healthy donors were incubated at 37°C for 30 min with PBS (resting), CL097 (5  $\mu$ g/ml), or TNF $\alpha$  (20 ng/ml). Samples were then incubated with fMLF (10<sup>-7</sup> M) or PBS (negative control) for another 5 min. A total of 100  $\mu$ L of each sample was then stained with 10  $\mu$ L of PE-conjugated anti-human CD11b monoclonal antibody (BD Biosciences, San Jose, CA) or 10  $\mu$ L of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human flavocytochrome b558 monoclonal antibody 7D5 (MBL Medical and Biological Laboratories, Naka-Ku Nagoya, Japan) for 30 min at room temperature in the dark. Red cells were lysed with BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences), and white cells were resuspended in 1% paraformaldehyde-PBS and kept on ice until flow cytometry. Nonspecific antibody binding was determined on cells incubated with the same concentration of an irrelevant antibody of the same isotype.

### **Flow cytometry**

Forward and side scatter were used to identify the neutrophil population and to gate out other cells and debris in a FACS CantoII (BD Biosciences). The purity of the gated cells was assessed by using monoclonal anti-CD15 antibodies (BD Biosciences). The mean fluorescent intensity of ethidium, CD11b-positive cells and 7D5-positive cells was then determined in the neutrophil populations. Five thousand events per sample were analyzed, and all results were obtained with a constant photomultiplier gain value. Results were expressed as mean fluorescence intensity (MFI).

## Western Blotting Analysis

Neutrophils ( $15 \times 10^6$ ) in HBSS (400  $\mu$ L) were treated with CL097, or PMA, or TNF $\alpha$  for the indicated times and at the indicated concentrations at 37°C with mild shaking. The reaction was stopped by adding 5X concentrated Laemmli sample buffer (30) containing 5 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2.5 mmol/L p-NPP, 10 mmol/L NaF, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L EGTA, 20  $\mu$ g/L leupeptin, 20  $\mu$ g/L pepstatin and 20  $\mu$ g/L aprotinin. Samples were then incubated for 2 min in boiling water (100°C) and stored at -80°C until use. Neutrophils lysates were sonicated and subjected to 10% SDS-PAGE (eq. of  $1 \times 10^6$  cells/well), using standard techniques (30). The separated proteins were transferred to nitrocellulose (31), which was blocked with 5% milk in Tris-buffered saline containing Tween 20 (TBS-T) for 1 h. After blocking, the membranes were probed with the appropriate antibody, i.e., anti-phospho-Ser315-p47phox (1:2000), anti-phospho-Ser320-p47phox (1:2000), anti-phospho-Ser328-p47phox (1:2000), anti-phospho-Ser345-p47phox (1:10,000), anti-p47phox (1:5000), anti-phospho-p38 MAPK Thr180/Tyr182 (1:1000), anti-phospho-ERK1 (T202/204)/ERK2 (T185/Y187) (1:2000), followed by incubation with HRP-labeled goat anti-rabbit antibody (1:5000). For the anti TLR7 and TLR8 blots, resting neutrophils and monocytes were lysed, subjected to SDS-PAGE and Western Blot using the anti-TLR7 (1:500) and anti TLR8 (1:500) antibodies. The protein bands were revealed by using enhanced chemiluminescence (Santa Cruz, CA, USA). The intensity of phosphorylated-p47phox and p47phox bands were quantified by densitometry using the Image J analysis program. Phosphorylated intensities were corrected for the corresponding amounts of p47phox present on the membrane.

## Pin1 activity assay

Pin1 activity was measured using a previously described technique, with some modifications (27). Briefly, neutrophils were lysed by sonication (twice for 10 s at 4°C) in lysis buffer containing 50 mM Hepes, 100 mM NaCl, 0.25% CHAPS, 5 mM NaF, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate and 1 mM EGTA. The assay mixture consisted of 93  $\mu$ L of HEPES buffer (50 mM HEPES, pH 7.8, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.04 mg/ml BSA), 5  $\mu$ L of cell lysate (eq105) and 2  $\mu$ L (20 mg/ml) of trypsin solution (Sigma). The reaction was started by adding 50  $\mu$ L (720  $\mu$ M) of the peptide Trp-Phe-Tyr-Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Arg-pNA (NeoMPS, France), and the p-nitroaniline (PA) released was continuously followed for 4 min by spectrophotometry at 390 nm.

## Statistical analysis

All results are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Significant differences ( $p < 0.05$ ) were identified with Student's t tests and the by one-way ANOVA followed by Tukey's pos-thoc test using 4.0 software (Graph Pad Software).



## Results

### **CL097 induces priming of fMLF-induced superoxide and ROS production by human neutrophils**

The effect of CL097, a TLR7/8 agonist, on neutrophil superoxide and ROS production is not known. We used the cytochrome c reduction assay to detect the extracellular superoxide anion production and the luminol-amplified chemiluminescence assay to detect the intracellular and extracellular (total) ROS production. In initial experiments, CL097 alone (0.25-20  $\mu\text{g/ml}$ ) did not induce extracellular superoxide anion production nor total ROS production by human neutrophils (data not shown). To determine if CL097 affected the fMLF-induced superoxide production, cells were then incubated in the absence or presence of CL097 (0.25-20  $\mu\text{g/ml}$ ) for 30 min, then stimulated with fMLF (10<sup>-7</sup> M). Results show that CL097 induced a clear increase of fMLF-induced superoxide (Fig. 1A) and ROS (Fig. 1B) production by neutrophils with a maximum response within the 2.5-5  $\mu\text{g/ml}$  concentration range, followed by a decreased response at concentrations higher than 5  $\mu\text{g/ml}$ . The CL097-effect was time-dependent, as treatment for 30 min with 5  $\mu\text{g/ml}$  produced the maximum effect on extracellular superoxide production (Fig. 1C) and treatment for 15 min produced the maximum effect on total ROS production and (Fig. 1D). Using DHE and flow cytometry analysis which detect intracellular ROS production we confirmed that CL097 alone had no effect on intracellular ROS production by blood neutrophils but enhanced fMLF-induced intracellular ROS production (Fig 1E). These data indicate that CL097 by binding to the TLR7/8 receptors expressed in human neutrophils, induces activation of downstream pathways that lead to enhanced activation of the NADPH oxidase when stimulated by the chemotactic peptide fMLF. TLR7/8 expression in neutrophils was confirmed by Western blotting using commercially available anti-TLR7 or anti-TLR8 antibodies and human monocytes as control (Fig. 1F).

### **CL097 induces cytochrome b558 translocation at the plasma membranes**

Priming of neutrophil superoxide production is controlled by translocation of the cytochrome b558 from the intracellular granules to the plasma membrane and by partial p47phox phosphorylation (18). We thus first examined whether the CL097-induced priming of superoxide production was associated with cytochrome b558 translocation using a specific anti-cytochrome b558 antibody (FITC-7D5 monoclonal antibody) recognizing the extracellular cytochrome b558 epitopes, the anti-CD11b antibody as a degranulation marker and flow cytometry. Results show that CL097 alone induced cytochrome b558 and CD11b translocation to the plasma membrane to the same extent as TNF $\alpha$  or fMLF (Fig. 2A and B). Moreover, an additive effect of CL097 and fMLF on cytochrome b558 translocation was found.

### **CL097 induces the phosphorylation of p47phox on specific sites and enhances fMLF-induced p47phox phosphorylation**

Activation of the neutrophil NADPH oxidase by fMLF or PMA is accompanied by the phosphorylation of the regulatory subunit of NADPH oxidase, p47phox, on serines 303-379 in the C-terminal region (20). In contrast, priming of neutrophils with TNF $\alpha$  or GM-CSF results in the phosphorylation of p47phox on a single site, Ser345 (26). Thus, we examined whether CL097-induced priming of superoxide production was associated with p47phox phosphorylation using specific anti-phosphoSer antibodies developed in our laboratory (27). Interestingly, Western blotting analysis indicated that CL097 selectively induced the phosphorylation of p47phox on three serines, Ser315, Ser328, and Ser345 (Fig. 3A and 3B), which are also phosphorylated by PMA along with Ser303/304, and Ser320, as expected, while TNF $\alpha$  induced the phosphorylation of Ser345 only. The CL097-induced p47phox phosphorylation was time-dependent (Fig. 4A and 4B), with a time scale similar to that of the CL097-induced priming of superoxide production.

The peptide fMLF ( $10^{-7}$  M) induces a very weak phosphorylation of the same serines as PMA (27). We tested the effect of CL097 on fMLF-induced p47phox phosphorylation by treating purified neutrophils with CL097 or fMLF, alone or sequentially, and analyzing the phosphorylation of p47phox on specific serines by Western blotting. Priming with CL097 followed by fMLF stimulation markedly increased p47phox phosphorylation on Ser315 and Ser328, showing that phosphorylation of these sites is primed by the TLR7/8 agonist (Fig. 5 A and B). Surprisingly, Ser345 appears to be maximally phosphorylated by CL097 and fMLF did not further enhance its phosphorylation. Ser303/304 and Ser320 were not phosphorylated under these conditions.

### **CL097 induces the phosphorylation of ERK1/2, p38MAPKinse, PKC $\alpha$ and inhibitors of these protein kinases inhibit CL097-induced p47phox phosphorylation and NADPH oxidase hyperactivation**

As CL097 induced p47phox phosphorylation on Ser315, Ser328 and Ser345, we investigated the pathways that may be involved. We first tested if CL097 was able to activate the major protein kinases known to be involved in p47phox phosphorylation in human neutrophils. Indeed, a kinetic study (0 to 45 min) showed that CL097 alone induced the phosphorylation of ERK1/2, p38MAPK and PKC with a time course similar to that of p47phox phosphorylation on Ser315, Ser328 and Ser345 (Fig. 6A and 6B).

As Ser345 is located in a sequence recognized and phosphorylated by MAP Kinases (-PXSP), and Ser315 and Ser328 are a known PKC phosphorylation sites, we tested the effects of kinase inhibitors on p47phox phosphorylation, i.e., PD98059, which inhibits MEK1/2 (the upstream activator of ERK1/2), SB203580, a p38 MAPK inhibitor, GF109203X, a PKC inhibitor and genistein, a broad range protein tyrosine kinase inhibitor. Results show that pretreatment of neutrophils with SB203580, PD98059 or genistein resulted in the inhibition of

CL097-induced p47phox phosphorylation on Ser345, while GF109203X had no effect (Fig. 7A). Interestingly, phosphorylation of p47phox on Ser315 and 328, which are not located within a MAP Kinase phosphorylation site, was also inhibited by SB203580 and PD98059 (Fig. 7B). GF109203X inhibited Ser328 phosphorylation but not Ser315 phosphorylation, and genistein inhibited phosphorylation of both sites. These results suggest that ligation of the TLR7/8 by CL097 activates several kinases that participate to the phosphorylation of three critical serines in the C-terminal portion of p47phox.

To investigate whether p38MAPKinase, ERK1/2, PKC and tyrosine kinases are involved in CL097-induced priming of NADPH oxidase, we tested their inhibitors on this process. Interestingly, results show that SB203580, the p38MAPkinase inhibitor did not affect fMLF-induced superoxide anion production but inhibited CL097-induced priming (Fig. 7C). PD98059, GF109203X and genistein inhibited both fMLF-induced superoxide anion and CL097-induced priming (Fig. 7C).

### **The proline isomerase Pin1 controls CL097-induced priming of NADPH oxidase by regulating p47phox phosphorylation**

We have previously shown that Pin1 is essential for TNF $\alpha$ -induced priming of superoxide production by human neutrophils as it binds to phosphorylated Ser345-p47phox to facilitate the phosphorylation on other sites such as Ser315 and 328 (27). Considering that CL097 strongly induced the phosphorylation of Ser345, we investigated the role of Pin1 in CL097-induced priming. As previously reported, basal Pin1 activity was observed in resting neutrophils (27). Incubation of neutrophils with CL097 resulted in the stimulation of Pin1 activity (Fig. 8A), which was inhibited by the selective Pin1 inhibitor, juglone (27). To test the role of Pin1 in CL097-induced priming of ROS production, neutrophils were incubated in the absence or presence of juglone (250 nM) for 30 min, then treated with CL097 (5 $\mu$ g/ml) and stimulated with fMLF (10<sup>-7</sup> M) before measuring superoxide production with the cytochrome c reduction assay. Juglone did not affect fMLF-induced superoxide production (Fig. 8B). As expected, CL097 primed fMLF-induced ROS production by neutrophils in the absence of juglone. Pre-treatment of neutrophils with juglone completely abrogated the priming effect of CL097 (Fig. 8B). Juglone did not affect neutrophil viability at the concentrations tested (data not shown).

To further understand the role of Pin1 in CL097-induced priming of NADPH oxidase activation, we tested the effect of juglone on p47phox phosphorylation on Ser315, 328 and 345 induced in CL097-primed and fMLP-stimulated neutrophils. Results show that CL097 enhanced fMLF-induced phosphorylation of p47phox on Ser328 and Ser315 (Fig. 9A and 9B) and the Pin1 selective inhibitor juglone inhibited this markedly increased phosphorylation. Phosphorylation of Ser345 was not affected by juglone as previously described (27). Taken together, these results suggest that Pin1 regulates phosphorylation on Ser315 and Ser328 and the priming of fMLF-stimulated ROS production by human neutrophils.

## Discussion

In the present study, we have demonstrated by several approaches that TLR7/8 activation in human neutrophils by its agonist CL097 induces NADPH oxidase priming, resulting in an increase of the fMLF-stimulated ROS production. We also show that the engagement of TLR7/8 induces the phosphorylation of the cytosolic NADPH oxidase subunit p47phox on Ser315, Ser328 and Ser345 along with translocation of cytochrome b558 to the plasma membrane. After stimulation with fMLF, the phosphorylation of Ser315 and Ser328 but not that of S345 was markedly increased. Our results also suggest that p38MAPKinase and ERK1/2 are necessary for the phosphorylation of Ser345, PKC is involved in the phosphorylation of Ser328 and Ser315 is phosphorylated by a different, yet unidentified, protein kinase. These pathways could be controlled by a common upstream protein tyrosine kinase, which was inhibited by genistein. Moreover, our results show that TLR7/8 induces proline isomerase Pin1 activation and inhibition of this enzyme by the selective inhibitor juglone resulted in the inhibition of CL097-primed and fMLF-stimulated phosphorylation of p47phox on Ser315 and 328 and of NADPH oxidase hyper-activation.

TLR7 and TLR8 are phylogenetically and structurally very close (4). Several studies have previously examined the expression of TLR7 and TLR8 in human neutrophils. While the expression of TLR8 was clearly demonstrated at the mRNA and protein levels (32-38), some studies have reported the expression of TLR7 in human neutrophils (32, 33) while other studies did not detect its expression (37, 38). In this study, although commercial antibodies do not have high affinity, we detected TLR7 and TL8 in human neutrophils and monocytes. TLR7 and TLR8 are located in the intracellular endosomes (4); further studies will be conducted to localize TLR7/8 in human neutrophils.

While single-stranded viral RNA (ssRNA) is the natural ligand of TLR7 and TLR8, the imidazoquinoline resiquimod (R848) is recognized as a potent synthetic agonist of TLR7/8 (33). CL097 is a highly water-soluble derivative of R848, which also acts on TLR7/8 (39). The effects of CL097 on neutrophil functions have not been previously studied; however, R848 was shown to induce several neutrophil functions such as cytokine production (33, 37, 38), degranulation (33, 38), chemotaxis (33), phagocytosis (33), survival (40) and enhanced leukotriene B4 and PAF biosynthesis (35). The effect of R848 on neutrophil ROS production is not clear as some studies have reported that R848 can by itself induce a weak NADPH oxidase activation in neutrophils (32, 38), and one study reported that R848 induces priming of neutrophil ROS production (33). The results reported here show that CL097, as R848, primes the fMLF-stimulated ROS production. However, the pathways induced by TLR7/8 activation in human neutrophils and how they regulate NADPH oxidase activation were unknown until now.

NADPH oxidase activation and regulation is controlled by the phosphorylation of its cytosolic component p47phox on serines located between Ser303 and Ser379 (20). It is clear that stimulation of neutrophils by high concentrations of the chemotactic peptide fMLF or by the PKC agonist PMA induces complete phosphorylation of p47phox (20). Treatment of

neutrophils with priming agents such as the proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$  and GM-CSF) induces partial phosphorylation of p47phox on Ser345, a MAP Kinase phosphorylation site (26). Phosphorylation of p47phox on Ser345 is a critical mechanism in GM-CSF- and TNF $\alpha$ -induced priming of fMLF-induced ROS production by neutrophils as it enhances fMLF-induced p47phox phosphorylation on other sites (Ser315, 320, 328) (27). Interestingly, in this study we show that the TLR7/8-agonist CL097 induced the phosphorylation of p47phox on Ser345, 328 and Ser315 and primed fMLF-induced phosphorylation of Ser328 and 315 but not Ser345. CL097 alone induced the phosphorylation of p38 MAPK and ERK1/2 in human neutrophils. Interestingly, activation of these two MAP kinases by TLR7/8 agonists has also been observed in other cell types, such as monocytes, lymphocytes and dendritic cells where it is involved in the nuclear translocation of the transcription nuclear factor (NF)- $\kappa$ B, which controls the expression of proinflammatory cytokine genes (39, 40). In eosinophils, stimulation by R848 (TLR7/8 agonist) led to p38 MAP kinase activation only (32). To investigate the role of the MAP kinases in these phosphorylations, we used the p38MAP Kinase inhibitor SB203580 and the MEK1/2 inhibitor PD98059. Both inhibitors prevented not only CL097-induced p47phox phosphorylation on Ser345 but also the phosphorylation of Ser315 and Ser328. It is noteworthy that Ser345 is located in a Pro-directed sequence recognized by MAP Kinases, but Ser315 and Ser328 are not. These results suggest that p38 MAPK and ERK1/2 are required to the phosphorylation of p47phox on Ser345 and that this initial phosphorylation could regulate the sequential phosphorylation on Ser315 and 328. We also show that GF109203X, a PKC inhibitor, inhibited the CL097-induced phosphorylation of Ser328 but not the phosphorylation of Ser315. Genistein, a general protein tyrosine kinase inhibitor, inhibited phosphorylation of all serines. These results suggest that engagement of TLR7/8 in human neutrophils induces several pathways involved in p47phox phosphorylation; p38MAPK and ERK1/2 are required for the phosphorylation of Ser345, PKC is involved in Ser328 phosphorylation, a third different yet not identified pathway is involved in Ser315 phosphorylation and an upstream protein tyrosine kinase controls these pathways. Interestingly, inhibitors that inhibit p47phox phosphorylation, inhibited CL097-induced NADPH oxidase priming.

We have previously shown that the proline isomerase Pin1 plays a role in p47phox phosphorylation (27). In this study, we show that TLR7/8 induces Pin1 activation in human neutrophils and that inhibition of Pin1 activity by juglone resulted in the inhibition of CL097-induced priming of fMLF-stimulated p47phox phosphorylation and ROS production by neutrophils. The initial phosphorylation of p47phox on Ser345 results in recruitment of the activated Pin1 (27), which in turn will induce conformational changes of p47phox to facilitate phosphorylation of Ser315 and Ser328 by the other kinases. Inhibiting the phosphorylation of Ser345 by MAP kinases will prevent Pin1 recruitment, thereby resulting in inhibition of Ser 315 and 328 phosphorylation. This could explain the inhibitory effect of SB203580 and PD98059 on Ser315 and Ser328 phosphorylation. Similarly, inhibiting the activity of Pin1 with juglone will prevent recruitment of activated Pin1 by phosphorylated Ser345-p47phox, and phosphorylation of Ser 315 and 328. Thus, Pin1 is a critical factor in TLR7/8-induced hyper-activation of neutrophil NADPH oxidase and excessive ROS generation.

We also found that CL097 induced a significant cytochrome b558 translocation to the plasma membrane. This effect was comparable to the fMLF and TNF $\alpha$ - induced translocation and could account for CL097-induced NADPH oxidase hyperactivation. It is known that p38MAPKinase is involved in TNF $\alpha$ - and LPS- induced cytochrome b558 translocation (29). The pathways involved in CL097-induced cytochrome b558 translocation are under investigation in our laboratory.

The single-stranded viral RNA (ssRNA) is the natural ligand of TLR7 and TLR8 (33). Our results suggest that ssRNA could induce neutrophil NADPH oxidase hyperactivation during viral infection and TLR7/8 may mediate viral infection-induced inflammation. Recently Wang et al., have shown that influenza virus induced TLR7/8-mediated neutrophil cytokine production (41) and other studies reported that TLR7/8 agonists induced neuroinflammation (39) and skin inflammation with neutrophil infiltration in mice (42). TLR7/8-mediated NADPH oxidase hyperactivation and excessive ROS production could participate to these inflammatory reactions.

The results presented in this manuscript clearly show that the TLR7/8 agonist CL097 induced priming of neutrophil NADPH oxidase activation and p47phox phosphorylation on selective sites (Ser345, 328 and 315). The results also show that activation of TLR7/8 induced Pin1 activation in human neutrophils and suggest that Pin1 could act as an amplifier of p47phox phosphorylation and ROS production at inflammatory sites.

## **Acknowledgments**

We thank Dr Martine Torres for critically reading this manuscript.

We thank Pr Hammadi Attia and Saloua Lassoued for their support

## References

1. Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6:173-182.
2. Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80:617-653.
3. Kawai, T., and S. Akira. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384.
4. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira. 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388:621-625.
5. Lee, W. L., R. E. Harrison, and S. Grinstein. 2003. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect* 5:1299-1306.
6. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
7. van Bruggen, R., A. Drewniak, A. T. Tool, M. Jansen, M. van Houdt, J. Geissler, T. K. van den Berg, H. Chapel, and T. W. Kuijpers. 2010. Toll-like receptor responses in IRAK-4-deficient neutrophils. *J Innate Immun* 2:280-287.
8. Jin, M. S., S. E. Kim, J. Y. Heo, M. E. Lee, H. M. Kim, S. G. Paik, H. Lee, and J. O. Lee. 2007. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. *Cell* 130:1071-1082.
9. Kang, J. Y., X. Nan, M. S. Jin, S. J. Youn, Y. H. Ryu, S. Mah, S. H. Han, H. Lee, S. G. Paik, and J. O. Lee. 2009. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 31:873-884.
10. Akashi-Takamura, S., and K. Miyake. 2008. TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* 20:420-425.
11. Uematsu, S., K. Fujimoto, M. H. Jang, B. G. Yang, Y. J. Jung, M. Nishiyama, S. Sato, T. Tsujimura, M. Yamamoto, Y. Yokota, H. Kiyono, M. Miyasaka, K. J. Ishii, and S. Akira. 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 9:769-776.
12. Hoebe, K., P. Georgel, S. Rutschmann, X. Du, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, L. Shamel, T. Hartung, U. Zahring, and B. Beutler. 2005. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433:523-527.
13. Kawai, T., and S. Akira. 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 7:131-137.

14. Hassan, F., S. Islam, G. Tumurkhuu, J. Dagvadorj, Y. Naiki, T. Komatsu, N. Koide, T. Yoshida, and T. Yokochi. 2009. Involvement of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-M in toll-like receptor (TLR) 7-mediated tolerance in RAW 264.7 macrophage-like cells. *Cell Immunol* 256:99-103.
15. Francois, S., J. El Benna, P. M. Dang, E. Pedruzzi, M. A. Gougerot-Pocidalo, and C. Elbim. 2005. Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol* 174:3633-3642.
16. Babior, B. M. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93:1464-1476.
17. Groemping, Y., and K. Rittinger. 2005. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* 386:401-416.
18. El-Benna, J., P. M. Dang, and M. A. Gougerot-Pocidalo. 2008. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol* 30:279-289.
19. Nauseef, W. M. 2007. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 219:88-102.
20. El-Benna, J., P. M. Dang, M. A. Gougerot-Pocidalo, J. C. Marie, and F. Braut-Boucher. 2009. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med* 41:217-225.
21. El-Benna, J., P. M. Dang, M. A. Gougerot-Pocidalo, and C. Elbim. 2005. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53:199-206.
22. Jacobi, J., S. Sela, H. I. Cohen, J. Chezar, and B. Kristal. 2006. Priming of polymorphonuclear leukocytes: a culprit in the initiation of endothelial cell injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H2051-2058.
23. Conner, W. C., C. M. Gallagher, T. J. Miner, H. Tavaf-Motamen, K. M. Wolcott, and T. Shea-Donohue. 1999. Neutrophil priming state predicts capillary leak after gut ischemia in rats. *J Surg Res* 84:24-30.
24. Dang, P. M., C. Dewas, M. Gaudry, M. Fay, E. Pedruzzi, M. A. Gougerot-Pocidalo, and J. El Benna. 1999. Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47(phox). *J Biol Chem* 274:20704-20708.
25. Dewas, C., P. M. Dang, M. A. Gougerot-Pocidalo, and J. El-Benna. 2003. TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 171:4392-4398.



26. Dang, P. M., A. Stensballe, T. Boussetta, H. Raad, C. Dewas, Y. Kroviarski, G. Hayem, O. N. Jensen, M. A. Gougerot-Pocidalo, and J. El-Benna. 2006. A specific p47phox - serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest* 116:2033-2043.
27. Boussetta, T., M. A. Gougerot-Pocidalo, G. Hayem, S. Ciappelloni, H. Raad, R. Arabi Derkawi, O. Bournier, Y. Kroviarski, X. Z. Zhou, J. S. Malter, P. K. Lu, A. Bartegi, P. M. Dang, and J. El-Benna. 2010. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood* 116:5795-5802.
28. DeLeo, F. R., J. Renee, S. McCormick, M. Nakamura, M. Apicella, J. P. Weiss, and W. M. Nauseef. 1998. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest* 101:455-463.
29. Ward, R. A., M. Nakamura, and K. R. McLeish. 2000. Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 mitogen-activated protein kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome b558-containing granules. *J Biol Chem* 275:36713-36719.
30. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
31. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
32. Nagase, H., S. Okugawa, Y. Ota, M. Yamaguchi, H. Tomizawa, K. Matsushima, K. Ohta, K. Yamamoto, and K. Hirai. 2003. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol* 171:3977-3982.
33. Hayashi, F., T. K. Means, and A. D. Luster. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102:2660-2669.
34. Bellocchio, S., S. Moretti, K. Perruccio, F. Fallarino, S. Bozza, C. Montagnoli, P. Mosci, G. B. Lipford, L. Pitzurra, and L. Romani. 2004. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol* 173:7406-7415.
35. Hattermann, K., S. Picard, M. Borgeat, P. Leclerc, M. Pouliot, and P. Borgeat. 2007. The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B<sub>4</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub> and platelet-activating factor biosynthesis. *FASEB J* 21:1575-1585.
36. Wong, C. K., P. F. Cheung, W. K. Ip, and C. W. Lam. 2007. Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37:85-96.

37. Yanagisawa, S., A. Koarai, H. Sugiura, T. Ichikawa, M. Kanda, R. Tanaka, K. Akamatsu, T. Hirano, K. Matsunaga, Y. Minakata, and M. Ichinose. 2009. Oxidative stress augments toll-like receptor 8 mediated neutrophilic responses in healthy subjects. *Respir Res* 10:50.
38. Janke, M., J. Poth, V. Wimmenauer, T. Giese, C. Coch, W. Barchet, M. Schlee, and G. Hartmann. 2009. Selective and direct activation of human neutrophils but not eosinophils by Toll-like receptor 8. *J Allergy Clin Immunol* 123:1026-1033.
39. Butchi, N. B., S. Pourciau, M. Du, T. W. Morgan, and K. E. Peterson. 2008. Analysis of the neuroinflammatory response to TLR7 stimulation in the brain: comparison of multiple TLR7 and/or TLR8 agonists. *J Immunol* 180:7604-7612.
40. Smits, E. L., P. Ponsaerts, Z. N. Berneman, and V. F. Van Tendeloo. 2008. The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *Oncologist* 13:859-875.
41. Wang, J.P., GN. Bowen, C. Padden, A. Cerny, RW. Finberg, PE. Newburger, EA. Kurt-Jones. 2008. Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus. *Blood* 112:2028-2034.
42. van der Fits, L., S. Mourits , J.S. Voerman, M. Kant, L. Boon, J.D. Laman, F. Cornelissen, A.M. Mus, E. Florencia, EP. Prens, E. Lubberts. 2009. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* 182:5836-5845.

## Figure legends

**Figure 1. CL097 induces priming of fMLF-stimulated superoxide and ROS production by human neutrophils.** Neutrophils were pretreated with different concentrations of CL097 (0.5, 2.5, 5, 10 and 20  $\mu\text{g/ml}$ ) for 30 min at 37°C before stimulation with fMLF ( $10^{-7}$  M) and superoxide production was measured using the SOD-inhibitable cytochrome c reduction assay (100% corresponds to 4.5 nanomoles produced/ 1 million cells at  $10^{-7}$  M fMLF) (A) or luminol-amplified chemiluminescence (B). CL097 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) was incubated with neutrophils for 5, 15, 30 and 45 min before stimulation with fMLF ( $10^{-7}$  M) and superoxide anion measurement (C) or ROS detection (D). Blood was incubated with CL097 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) and hydroethidine (HE) for 30 min before stimulation with fMLF ( $10^{-7}$  M) and fluorescence (MIF) was detected in neutrophils by flow cytometry (ctl: control non treated cells) (E). Neutrophils and monocytes ( $1 \times 10^6$  cells) were lysed, proteins analyzed by SDS-PAGE and Western Blot and anti TLR7 or TLR8 antibody (F). Results represent means  $\pm$  SEM (n=4, \*\*p<0.01).

**Figure 2. CL097 induces cytochrome b558 and CD11b translocation to the plasma membranes.** (A) Whole-blood samples were incubated at 37°C for 30 min with PBS (resting) or CL097 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) alone for 30 min followed or not by fMLF ( $10^{-7}$  M) stimulation for 5 min. (B) Whole-blood samples were incubated at 37°C for 30 min with PBS (resting) or with TNF $\alpha$  (5 ng/ml) alone for 30 min followed or not by fMLF ( $10^{-7}$  M) stimulation for 5 min. Samples were stained with FITC-conjugated 7D5 antibody, which detects cytochrome b558 or an anti-CD11b-PE antibody and analyzed by flow cytometry as described in Materials and Methods. (C) Values from 4 different experiments were used for statistical analysis (n=4, p<0.05).

**Figure 3. CL097 induces phosphorylation of p47phox on specific sites in a concentration-dependent manner.** (A) Neutrophils ( $15 \times 10^6$  cells/ml) were incubated with various concentrations of CL097 (0.5, 2.5, 5, 10 and 20  $\mu\text{g/ml}$ ) for 30 min or with PMA (100 ng/ml) for 10 min or with TNF $\alpha$  (20 ng/ml) for 20 min. Cells were lysed, and proteins from  $1 \times 10^6$  cells were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-phospho-Ser345 antibody, anti-phospho-Ser328, anti-phospho-Ser320, anti-phospho-Ser315, anti-phospho-Ser303/304 or anti-p47phox antibody (p47phox); (B) Western blots from different experiments were scanned; phosphorylated and total p47phox were quantified by densitometry, and the intensity of phosphorylated p47phox was corrected for the protein amount of p47phox. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 4).

**Figure 4. CL097 induces phosphorylation of p47phox on specific sites in a time-dependent manner.** (A) Neutrophils ( $15 \times 10^6$  cells/ml) were incubated with CL097 (5 $\mu$ g/ml) for the indicated times (0, 15, 30, 45 and 60 min). Cells were lysed, and proteins from  $1.5 \times 10^6$  cells were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-phospho-Ser345, anti-phospho-Ser328, anti-phospho-Ser320, anti-phospho-Ser315, anti-phospho-Ser303/304 antibodies or anti-p47phox antibody (p47phox). (B) Western blots from different experiments were scanned; phosphorylated and total p47phox were quantified by densitometry, and the intensity of phosphorylated p47phox was corrected for the amount of p47phox. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 4).

**Figure 5. CL097 enhanced fMLF-stimulated phosphorylation of p47phox on specific sites.** (A) Neutrophils ( $15 \times 10^6$  cells/ml) were incubated with CL097 (5 $\mu$ g/ml) for 30 min or fMLF (10 $^{-7}$  M) for 1 min alone or sequentially. Cells were then lysed, and proteins from  $1.5 \times 10^6$  cells were analyzed with SDS-PAGE and immunoblotting with anti-phospho-Ser345, anti-phospho-Ser328, anti-phospho-Ser320, anti-phospho-Ser315, anti-phospho-Ser303/304 antibodies or anti-p47phox antibody; (B) Western blots from different experiments were scanned; phosphorylated and total p47phox were quantified by densitometry, and the intensity of phosphorylated p47phox was corrected for the amount of p47phox. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 4).

**Figure 6. CL097 induces ERK1/2, p38MAPKinase and PKC $\alpha$  phosphorylation in human neutrophils.** (A) Human neutrophils were incubated with CL097 at 37°C from 0 to 45 min. Proteins were denatured for SDS-PAGE and Western blotting analysis using an anti-phosphorylated Ser345 antibody (P-S345), anti-phosphorylated Ser328 (P-328), anti-phosphorylated Ser315 (P-315), anti-phosphorylated ERK1/2 (P-ERK 1/2), anti-phosphorylated p38 MAPK (P-p38 MAPK), anti-phosphorylated PKC- $\alpha$  (P-PKC- $\alpha$ ) or with antibodies directed against total p47phox. (B) Western blots from different experiments were scanned; phosphorylated and total p47phox were quantified by densitometry, and the intensity of phosphorylated p47phox was corrected for the amount of p47phox. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 4, \*\*p<0.01).

**Figure 7. Effects of protein kinase inhibitors on CL097-induced p47phox phosphorylation.** Human neutrophils were pre-incubated at 37°C for 30 min with protein kinase inhibitors (SB203580, 10  $\mu$ mol/L; PD98059, 50  $\mu$ mol/L; Genistein (100  $\mu$ mol/L) and GF109203X (5  $\mu$ mol/L)) before adding 5 $\mu$ g/ml CL097 for 30 min as indicated. Proteins were denatured for SDS-PAGE and Western blotting analysis using an anti-phosphorylated Ser345 antibody (P-Ser345) or an anti-p47phox antibody (A); or an anti-phosphorylated Ser328 antibody (P-Ser328) or an anti-phosphorylated Ser315 antibody (P-Ser315) (B). Western blots from different experiments were scanned; phosphorylated and total p47phox were quantified

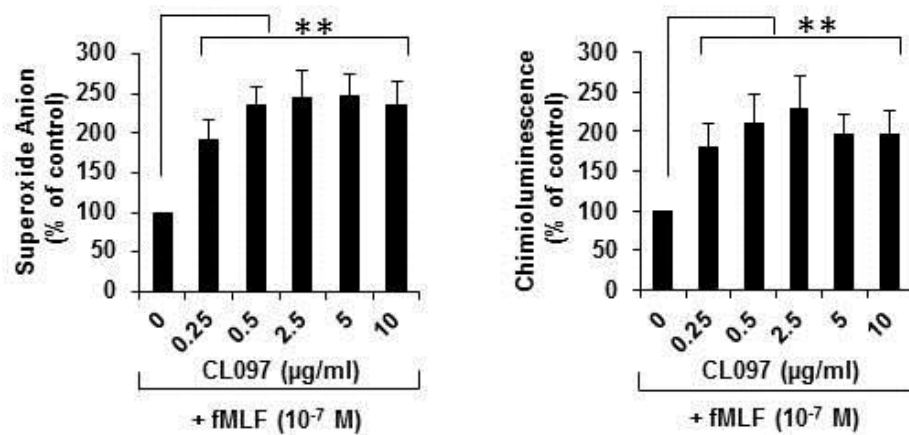
by densitometry, and the intensity of phosphorylated p47phox was corrected for the amount of p47phox (C). Neutrophils were pre-incubated at 37°C for 30 min with protein kinase inhibitors (SB203580, 10  $\mu$ mol/L; PD98059, 50  $\mu$ mol/L; Genistein (100  $\mu$ mol/L) and GF109203X (5  $\mu$ mol/L)), CL097 (5 $\mu$ g/ml) was added for 30 min and cells were stimulated with fMLF and superoxide anion was measured (D). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 4, \*\*p<0.01).

**Figure 8. The TLR7/8 agonist CL097 induces Pin1 activation in human neutrophils and effect of juglone on Pin1 activity and superoxide production.** (A) Neutrophils were incubated in the absence or presence of juglone (250 nM) for 30 min and then treated with CL097 (5  $\mu$ g/ml) before lysis. Pin1 activity was determined by measuring the absorbance at 390 nm of free pNA cleaved from a peptide Pin1 substrate Trp-Phe-Tyr-Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Arg-pNA; (B) Neutrophils were incubated with juglone (250 nM) for 30 min, then treated with CL097 (5  $\mu$ g/mL) for 30 min before stimulation with fMLF (10–7M) for 5 min. Superoxide production was measured by the SOD-inhibitable cytochrome c reduction assay. Data are mean  $\pm$  SEM (n=3, \*\*p<0.01).

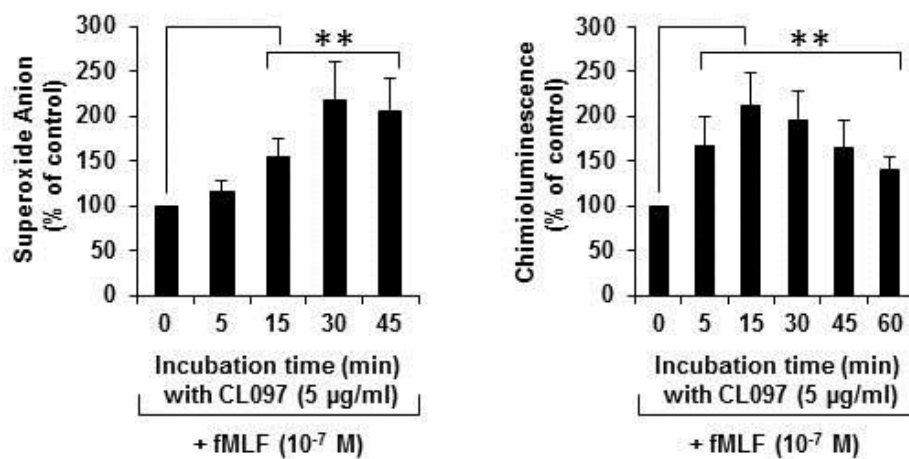
**Figure 9. Pin1 inhibitor juglone inhibits CL097-primed and fMLF-stimulated p47phox phosphorylation.** (A) Neutrophils were treated with CL097 (5 $\mu$ g/ml) and fMLF (10<sup>-7</sup> M), alone or sequentially, in the absence or presence of juglone (250 nM). Neutrophils were then lysed, and proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti-phospho-Ser315, anti-phospho-Ser328, anti-phospho-Ser345, and anti-p47phox antibodies; (B) Western blots from different experiments were scanned; phosphorylated and total p47phox were quantified by densitometry, and the intensity of phosphorylated p47phox was corrected for the amount of p47phox. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3, \*\*p<0.01).

Figure 1

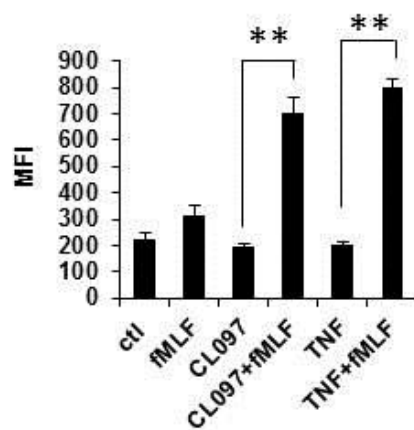
**A**



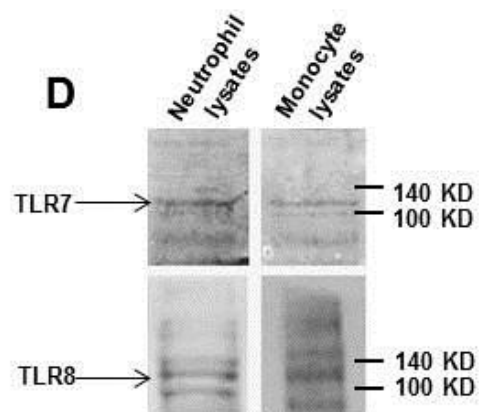
**B**



**C**



**D**



**Figure 2**

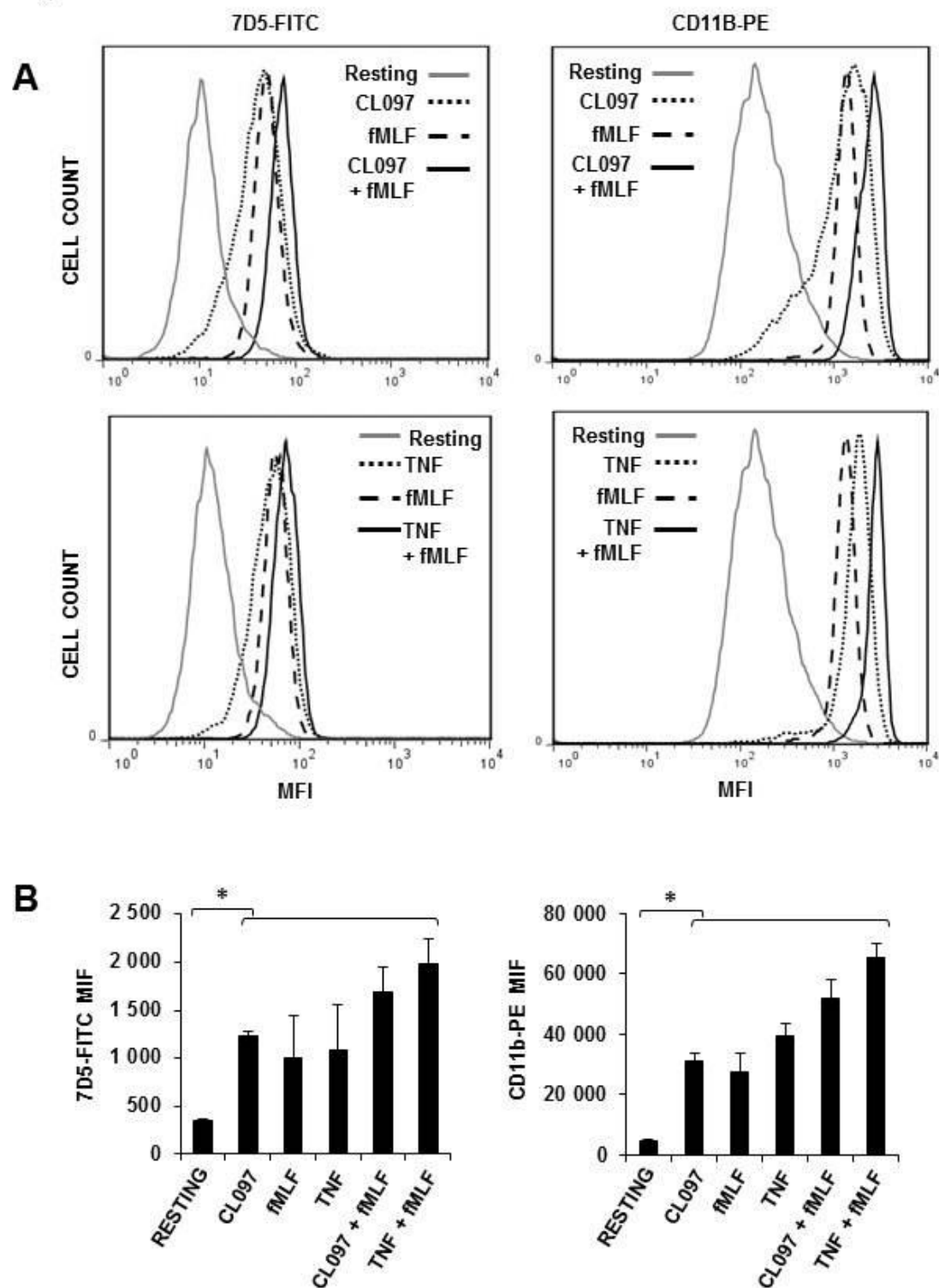


Figure 3

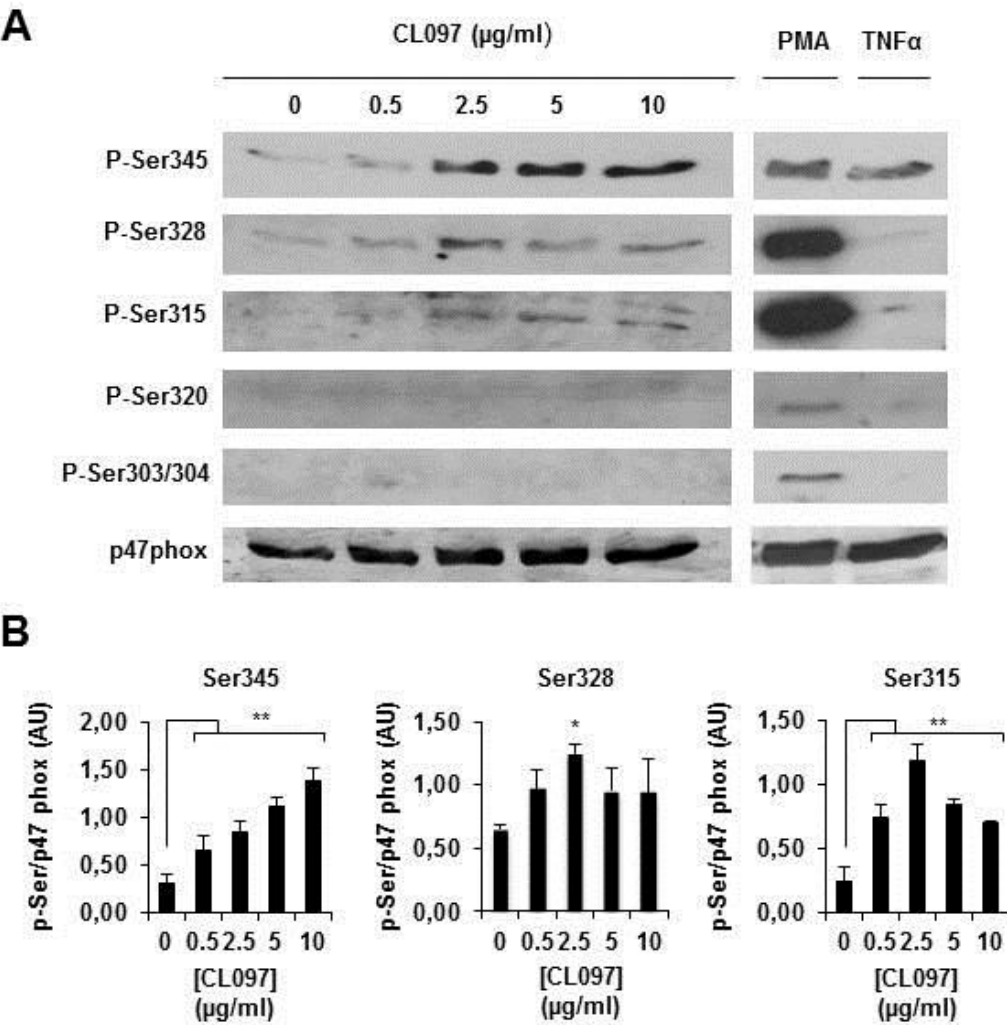
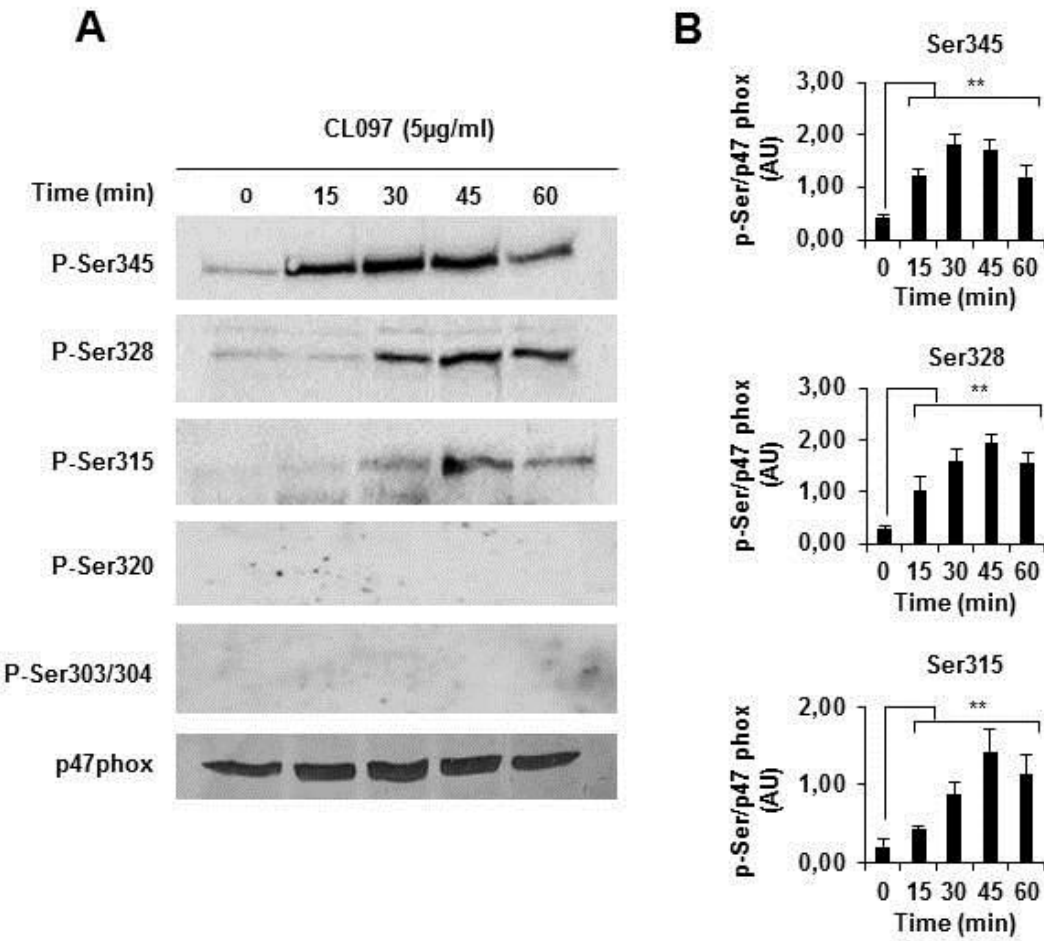




Figure 4



**Figure 5**

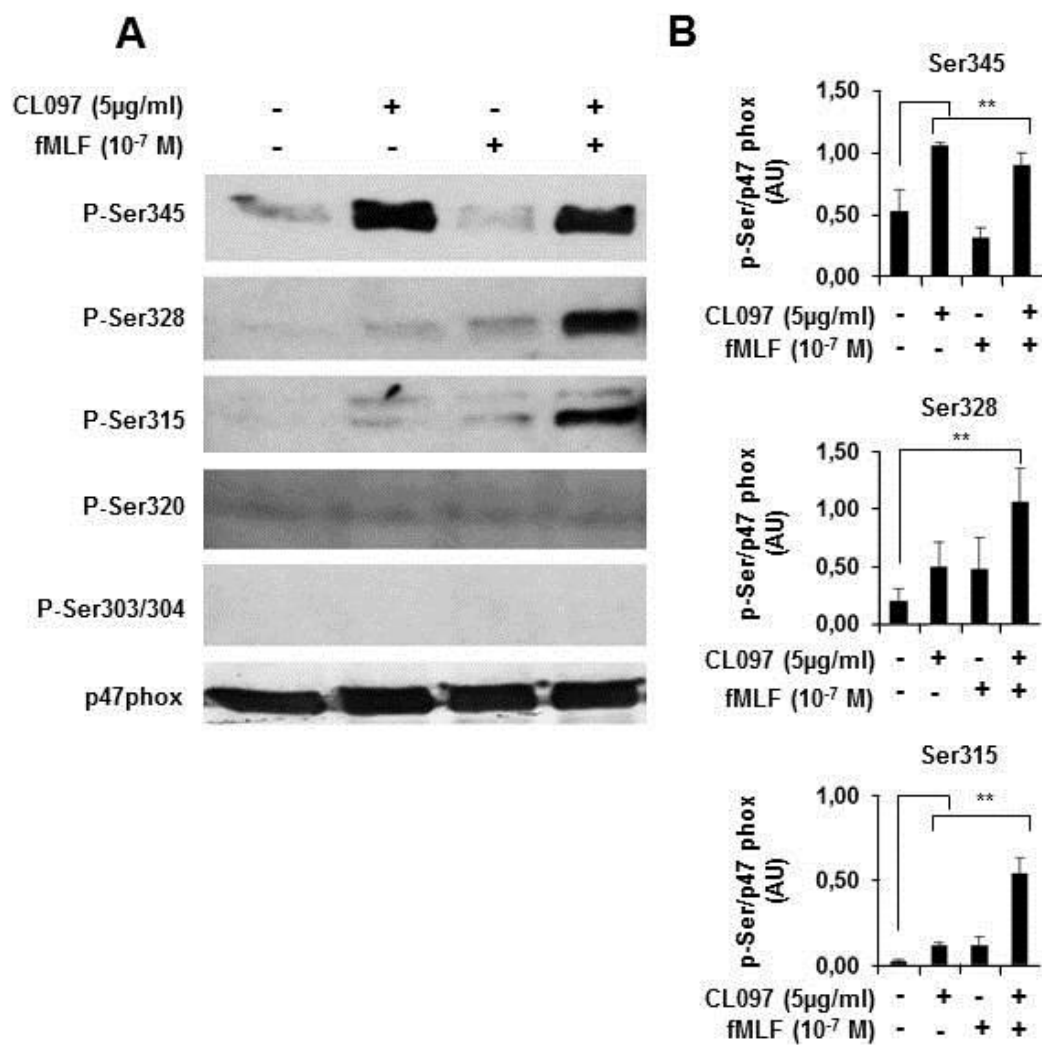


Figure 6

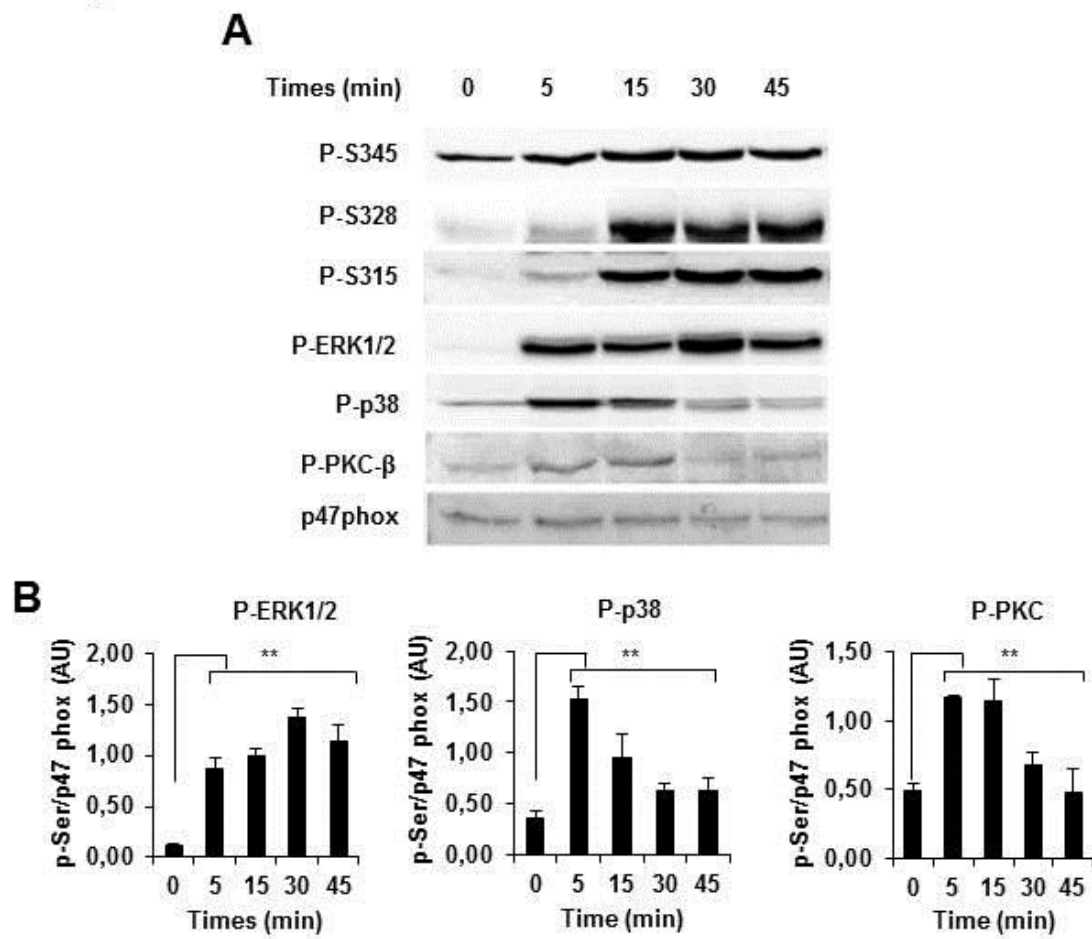


Figure 7

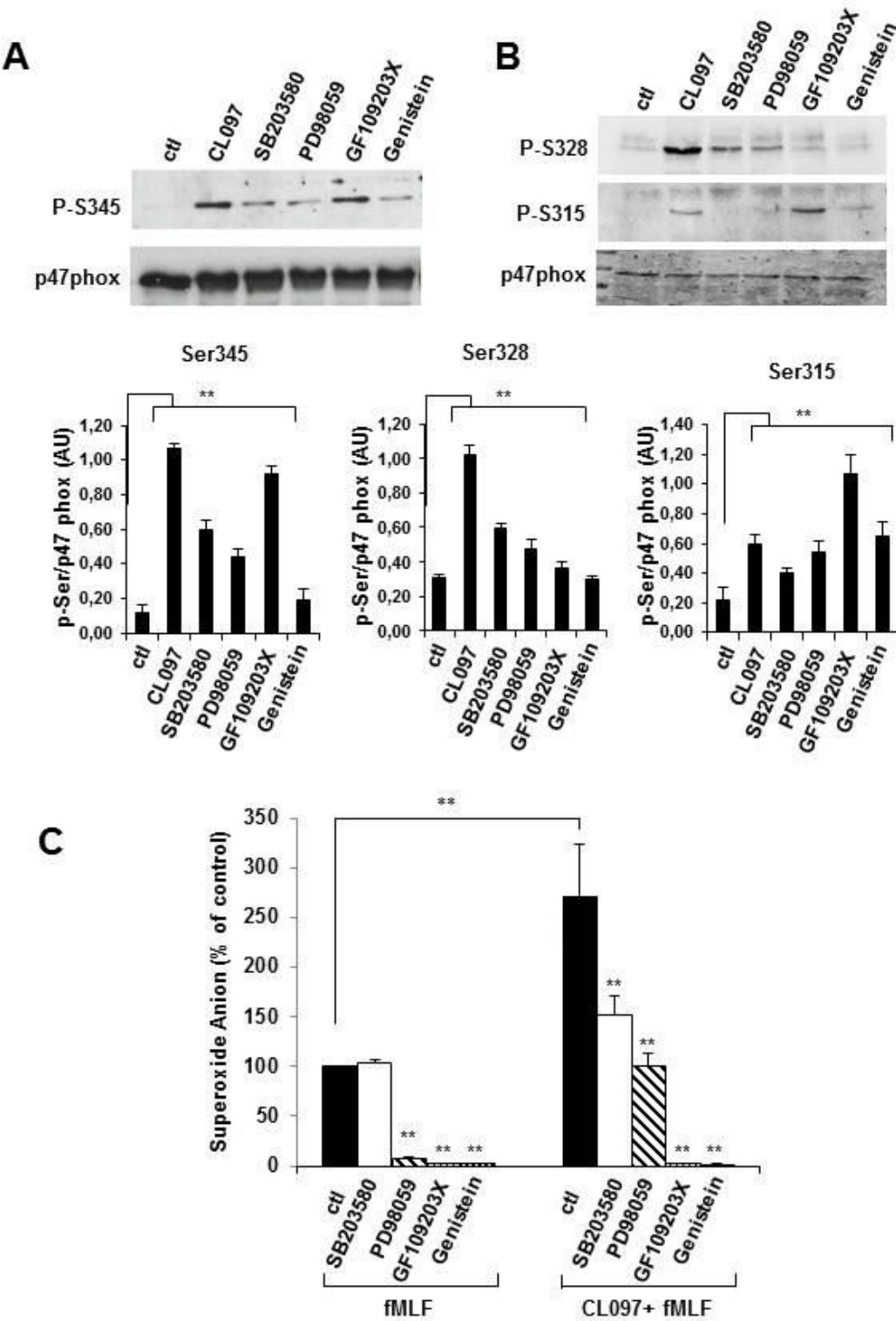


Figure 8

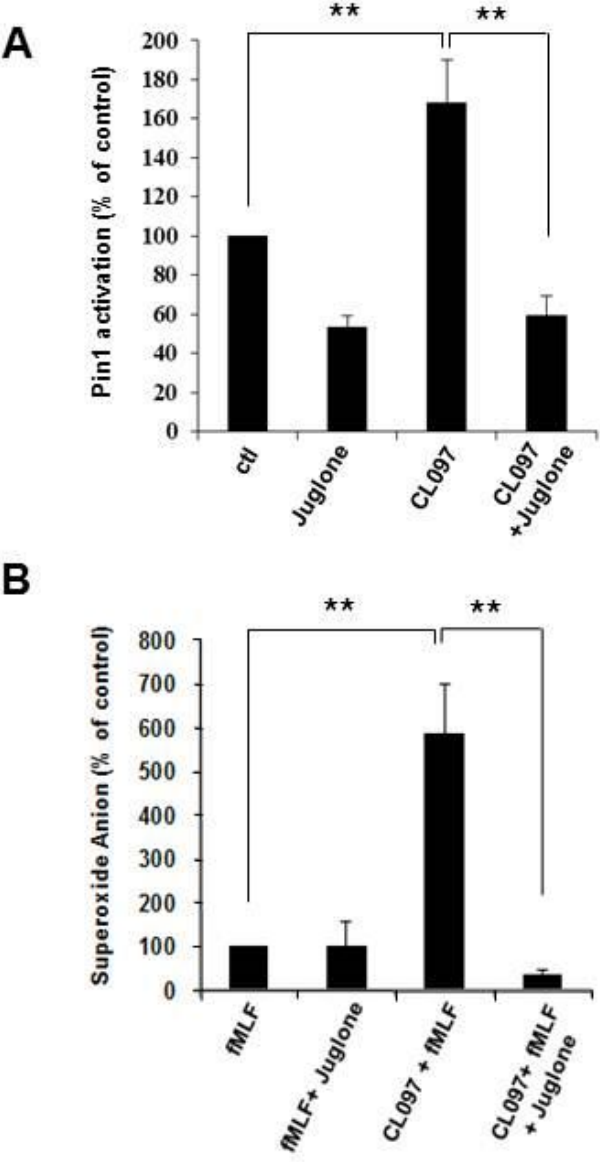
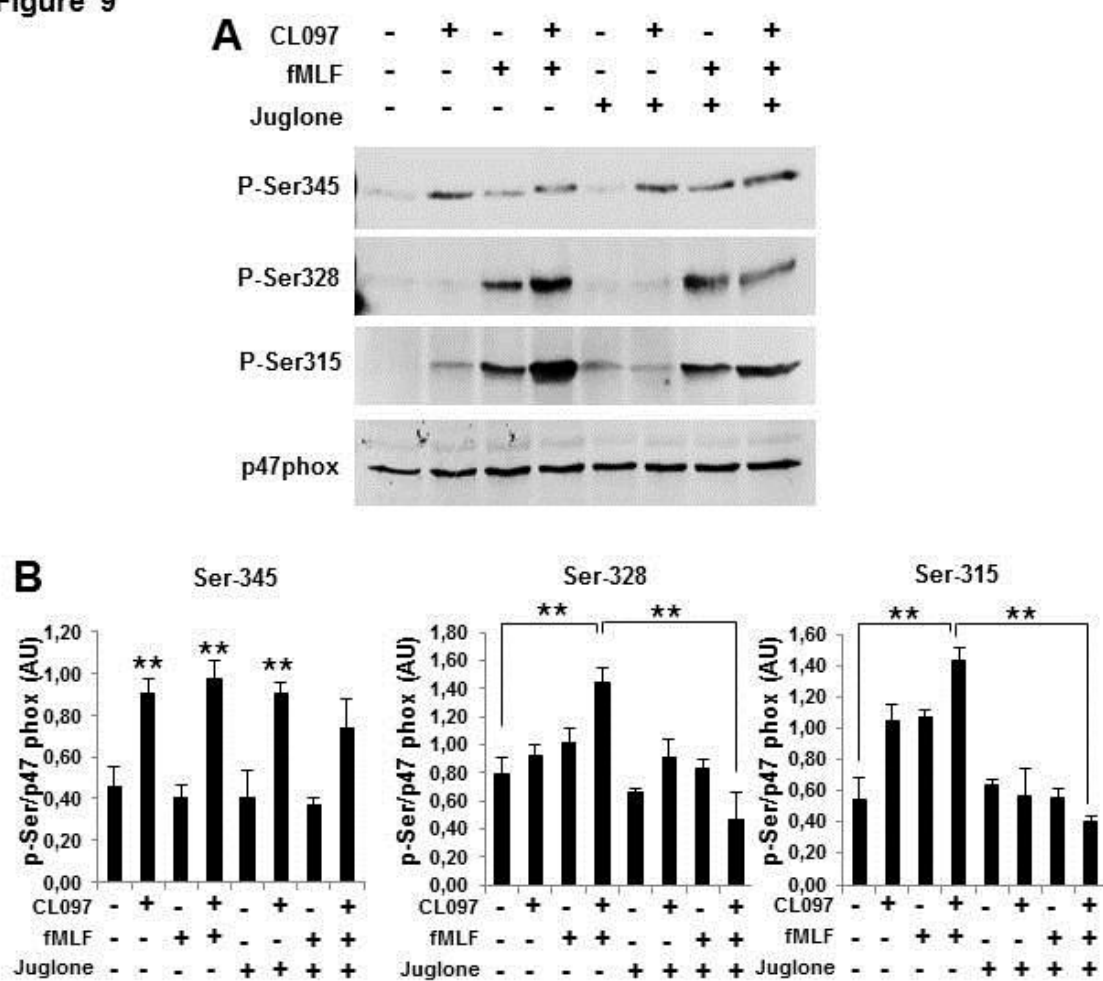


Figure 9



## **RESULTATS SUPPLEMENTAIRES**

**Le CL075, agoniste du TLR 8 mais pas la loxoribine, agoniste de TLR7, induit une augmentation de l'activation de la NADPH oxydase stimulée par le fMLF dans les neutrophiles humains.**

## **Introduction**

Dans la première partie de mon travail de thèse, j'ai clairement montré que l'activation des TLR7 et 8 par le CL097 induit une augmentation de l'activation de la NADPH oxydase dans les neutrophiles humains en induisant la phosphorylation de la p47phox et l'activation de la proline isomérase Pin1 (Makni-Maalej et al., soumis pour publication). Nous avons voulu dans cette deuxième partie du travail savoir si l'effet du CL097 passe via le TLR7, le TL8 ou les deux récepteurs. Le TLR7 et le TLR8 sont phylogénétiquement liés et structurellement proches. Les deux récepteurs sont capables de détecter et de reconnaître des séquences d'ARN simple brin viral et des molécules synthétiques de la famille des imidazoquinolines comme le R848 et son dérivé le CL097. En utilisant des souris déficientes en TLR7 ou TLR8, il a été montré qu'une nouvelle molécule, le CL075 est un agoniste spécifique du TLR8 et la loxoribine est un agoniste spécifique du TLR7 (Tableau 1) (Gorden et al., 2005). **Pour déterminer si le TLR7 ou le TLR8 ou les deux récepteurs induisent une hyperactivation de la NADPH oxydase, nous avons testé l'effet du CL075 et de la Loxoribine sur la production des FRO par les neutrophiles humains, la phosphorylation de la p47phox et l'activation de la proline isomérase Pin1 en utilisant les mêmes techniques utilisées dans la première partie de mon travail.**



## Résultats

### **Effet du CL075 et de la loxoribine sur la production de l'anion superoxide induite par le fMLF dans les neutrophiles humains.**

Nous avons comparé l'effet du CL075, loxoribine et le CL097 sur la production de l'anion superoxide en utilisant la technique de réduction du cytochrome *c*. Les résultats montrent que contrairement à la loxoribine qui n'a pas d'effet, le CL075 induit un effet primant de la production d'anions superoxides par les neutrophiles stimulés par le fMLF comparable à celui induit par le CL097 (figure 1A). Le traitement des cellules avec le CL075 et la loxoribine ne modifie pas l'effet primant du CL075. L'effet primant du CL075 sur la production de l'anion superoxide est similaire à celui du CL097 comme le montre l'effet dose de ces deux molécules (figure 1B et 1C). La Loxoribine n'a pas d'effet primant même à des concentrations inférieures ou supérieures à 5 µg/ml (résultats non montrés).

### **Effet du CL075 et de la loxoribine sur la phosphorylation de la p47phox et des MAPKinases dans les neutrophiles humains.**

Nous avons montré dans le travail précédent (Article 1) que « le priming » de la NADPH oxydase des neutrophiles, en réponse au CL097, est associée à la phosphorylation de la p47phox au niveau de la Ser345 (site du priming de la NADPH oxydase), et de deux autres sites (Ser328, Ser315). Pour comprendre comment le CL075 induisait le priming de la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, nous avons décidé d'étudier son effet sur la phosphorylation de la p47phox. En utilisant des anticorps spécifiques des différents sites phosphorylés produits par notre laboratoire, nous avons montré que le CL075, de même que le CL097, induit la phosphorylation de la p47phox au niveau des serines 345, 328 et 315 (Figure 2). La loxoribine

n'a pas d'effet sur la phosphorylation des serines 345 et peu d'effet sur la phosphorylation des sérines 328 et 315. Cependant son présence avec le CL075 inhibe la phosphorylation de la serine 328 et 315 induite par ce dernier mais pas celle de la serine 345.

Etant donné que la Ser345 est un site de phosphorylation des MAPKinases (**Dang et al., 2006**), nous avons étudié l'effet des agonistes des TLR 7 et 8 sur la phosphorylation des ERK1/2 et de la p38MAPKinases, deux MAPKinases majeures dans les neutrophiles. Les résultats montrent que le CL075 induisait la phosphorylation des ERK1/2 et de la p38 (Figure 3A). La loxoribine toute seule induit une faible phosphorylation des ERK1/2 et p38 et elle inhibe la phosphorylation des ERK1/2 induite par le CL097 mais pas celle de la p38MAPKinase (Figure 3A). Ce résultat pourrait suggérer que la phosphorylation de la serine 345 induite par le CL075 implique plutôt la p38 MAPKinase et pas ERK1/2. Pour confirmer ce résultat nous avons utilisé des inhibiteurs de ces kinases, et nous avons montré que le PD98059, inhibiteur de la voie des ERK1/2, n'inhibe pas la phosphorylation de la serine 345 induite par le CL075 (Figure 3B). Alors que le SB203580, inhibiteur de la p38MAPKinase, l'inhibait (Figure 3B). Le GFX, un inhibiteur des PKC n'a pas d'effet sur la phosphorylation de la Ser345, alors que la génistéine, un inhibiteur des protéines tyrosines kinases, inhibe la phosphorylation de la serine S345 et celle de p38MAPKinase. Ce résultat suggère que le CL075 engageait plutôt la voie de p38MAPKinase pour induire la phosphorylation de la S345 de la p47phox. Les voies conduisant à la phosphorylation de la serine 328 et 315 restent à déterminer.

### **Effet du CL075 et de la loxoribine sur l'activation de la proline isomérase Pin1 dans les neutrophiles humains.**

Afin d'approfondir les mécanismes impliqués dans le priming induit par le CL075, nous avons étudié l'effet de cet agoniste sur l'activité de la proline isomérase Pin1. En effet, notre équipe avait préalablement montré que Pin1 en se fixant sur la sérine 345 phosphorylée lors du priming induit par le  $\text{TNF}\alpha$ , elle induisait un changement de conformation de la p47phox facilitant ainsi sa phosphorylation par d'autres kinases notamment les PKC (Boussetta, 2010). J'ai aussi montré (dans article 1) que l'activation des TLR7/8 par le CL097 active Pin1 dans les neutrophiles et que cette activation est inhibée par la Juglone, inhibiteur sélectif de Pin1. De plus, la juglone inhibe la production d'anion superoxyde par les neutrophiles primés par le CL097 puis stimulés par fMLF. Mes résultats montrent que le CL075 active Pin1 et cette activation est inhibée par la juglone (Figure 4). La loxoribine n'a pas d'effet sur l'activité de Pin1 (résultat non montré). Des résultats préliminaires montrent que la juglone inhibe l'effet primant du CL075 (résultats non montrés). Ces résultats montrent que l'activation de TLR8 induit l'activation de Pin1 dans les neutrophiles et que Pin1 pourrait amplifier la phosphorylation des autres sites de la p47phox intervenant dans l'hyper-production d' $\text{O}_2^-$  en réponse à un deuxième stimulus.

### **Effet du CL075 et de la loxoribine sur l'expression du cytochrome b558 à la membrane plasmique des neutrophiles humains.**

Le priming de l'activation de la NADPH oxydase est contrôlée par la phosphorylation partielle de la p47phox mais aussi par la translocation du cytochrome b558 des granules intracellulaires vers la membrane plasmique. Nous avons donc voulu étudié si le priming de la

production de l'anion superoxyde induit par le CL075 est associée à la translocation du cytochrome b558. Nous avons utilisé un anticorps anti-cytochrome b558 marqué au FITC (FITC-7D5) qui reconnaît les épitopes extracellulaires du cytochrome b558 et la technique de cytométrie de flux. Les résultats montrent que le CL075 induit la translocation du cytochrome b558 vers la membrane plasmique similaires aux effets du CL097 et du fMLF (Figure 5). En conclusion l'ensemble des résultats montre que le CL075 induit un priming de la production d'anions superoxydes par les neutrophiles comparable à celui induit par le CL097, alors que la Loxoribine n'a pas d'effet. Ces résultats suggèrent que l'effet de CL097 dépend des voies de signalisations engagées par le TLR8 mais pas par le TLR7. Ces voies engageaient la p38 MAPkinase pour phosphoryler la serine 345 et Pin1 qui pourrait induire un changement de conformation de la p47phox et faciliterait sa phosphorylation sur les autres sites pour une meilleure activation de la NADPH oxydase.

### **Légendes des figures**

**Tableau 1: Les agonistes des TLR7 et 8.** CL097 (imidazoquinolines ; dérivé du R848) agoniste commun des TLR 7 et 8, CL075 (thiazoloquinolone) agoniste spécifique du TLR8 et la LOXORIBINE (dérivé d'imiquimode ; une petite molécule synthétique antivirale) agoniste spécifique du TLR7. Les trois ligands sont des petites molécules synthétiques solubles dans l'eau. Agissent d'une façon similaire à celle des ARNss ; agonistes naturels des TLR7/8.

**Figure 1 : Effet du CL097, CL075 et de la loxoribine sur la production de l'anion superoxyde par les neutrophiles stimulés par le fMLF.** (A), Les neutrophiles du même donneur ont été traités respectivement par le CL097 à 5 µg/ml, le CL075 à 5 µg/ml, la

loxoribine à 10 µg/ml et finalement par le CL075 à 5 µg/ml et la loxoribine à 10 µg/ml ensembles pendant 30 min à 37°C, stimulés par le fMLF et la production de l'anion superoxide a été mesurée en utilisant la technique de réduction du cytochrome c. (B) et (C) Les neutrophiles ont été traités par différentes concentrations de CL097 et CL075 pendant 30 min à 37°C avant d'être stimulés avec du fMLF ( $10^{-7}$  M) et la production de l'anion superoxide a été mesurée en utilisant la technique de réduction du cytochrome c (100% correspond à 4.5 nanomoles / 1 million de cellules traitées avec le fMLF  $10^{-7}$  M). Les résultats représentent en moyenne  $\pm$  SEM (n=4).

**Figure 2 : Effet du CL097, CL075 et de la loxoribine sur la phosphorylation de la p47phox dans les neutrophiles.** Les neutrophiles ( $15 \times 10^6$  cellules/ml) ont été traités respectivement par le CL097 à 5 µg/ml, le CL075 à 5 µg/ml, la loxoribine à 10 µg/ml et finalement par le CL075 à 5 µg/ml et la loxoribine à 10 µg/ml ensembles pendant 30 min à 37°C. Les cellules ont été lysées, et les protéines dénaturées ( $1.5 \times 10^6$  cellules) ont été analysées par SDS-PAGE et Western Blot avec les anticorps anti-phospho-Ser345, anti-phospho-Ser328, anti-phospho-Ser315 ou l'anticorps anti-p47phox (p47phox).

**Figure 3 : Effet du CL097, CL075 et de la loxoribine sur la phosphorylation des MAPKinases et effet des inhibiteurs sur la phosphorylation de la p47phox sur la Ser345.**

(A) Les neutrophiles ont été incubés avec le CL097 à 5 µg/ml le CL075 à 5 µg/ml, la loxoribine à 10 µg/ml et finalement par le CL075 à 5 µg/ml et la loxoribine à 10 µg/ml ensembles pendant 37°C. (B) Les neutrophiles ont été incubés avec le SB203580, PD98059, GFX et la génistéine, avant de les traiter avec 5µg/ml de CL075 pendant 30 min. Les cellules

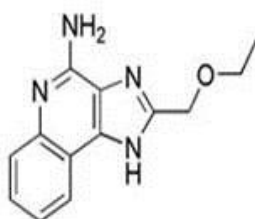
ont été lysées et les protéines dénaturées et analysées par SDS-PAGE et Western Blot avec les anticorps anti-phospho-Ser345, anti-phospho-p38, anti-phospho-ERK1/2 ou l'anticorps anti-p47phox.

**Figure 4 : Le CL075 induit l'activation de Pin1 dans les neutrophiles humains.** Les neutrophiles ont été incubés en absence et en présence de juglone (250 nM) pendant 30 min ensuite ils ont été traités avec le CL075 (5 µg/ml) avant leur lyse. L'activité de Pin1 a été déterminée par la mesure d'absorbance à 390 nm de pNA libre clivé à partir de Trp-Phe-Tyr-Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Arg-pNA, un substrat de Pin1. Les résultats représentent en moyenne  $\pm$  SEM (n=3).

**Figure 5 : Le CL075 induit la translocation du cytochrome b558 vers la membrane plasmique.** Le sang total a été incubé à 37°C pendant 30 min avec du PBS (repos) ou CL097 (5µg/ml), CL075 (5µg/ml) ou le fMLF pendant 30 min. Ensuite ces tubes ont été incubés avec l'anticorps anti-7D5 couplé à la protéine FITC. Les cellules ont été analysées par la technique de cytométrie en flux.

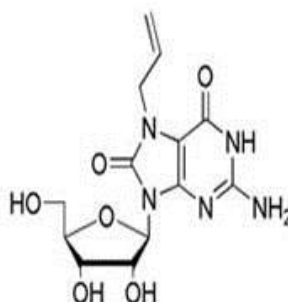
**Tableau 1: Les agonistes des TLR7 et 8**

**CL097**  
(TLR7 et 8)



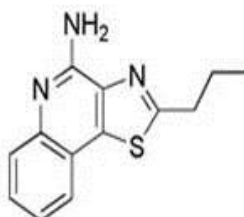
**Formule:**  
 $C_{13}H_{14}N_4O$   
**Poid moléculaire:**  
242.28

**Loxoribine**  
(TLR7)



**Formule:**  
 $C_{13}H_{17}N_5O_6$   
**Poid moléculaire:**  
339.3

**CL075**  
(TLR8)



**Formule:**  
 $C_{13}H_{13}N_3S$   
**Poid Moléculaire:**  
243.33

**Figure 1**

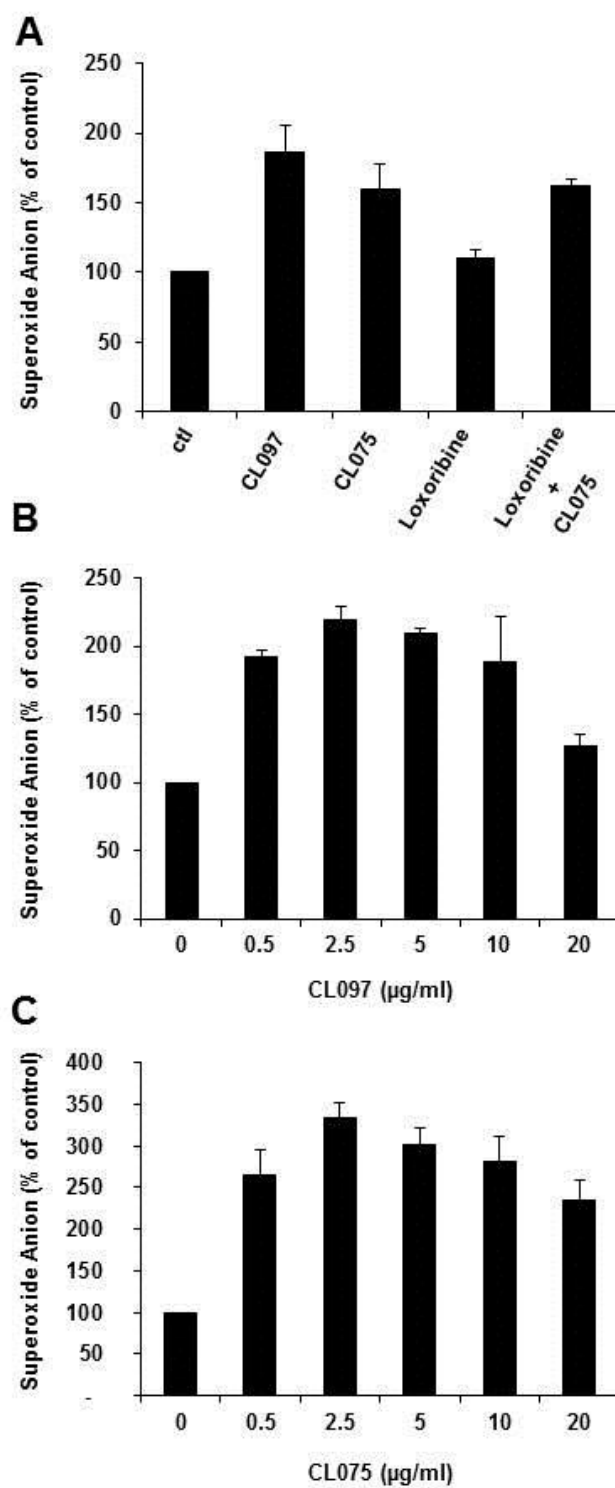
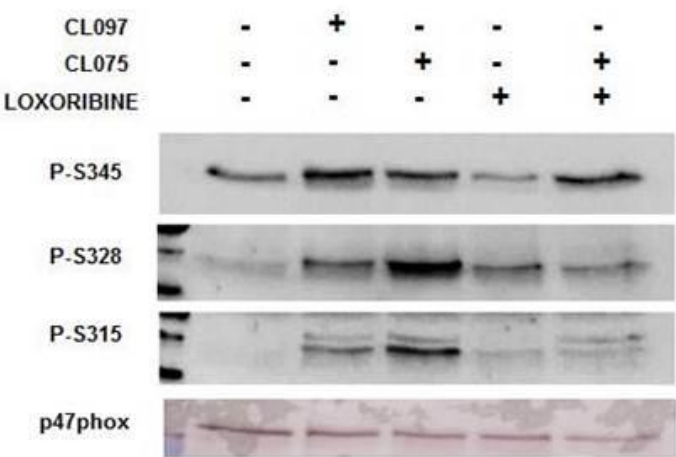




Figure 2



**Figure 3**

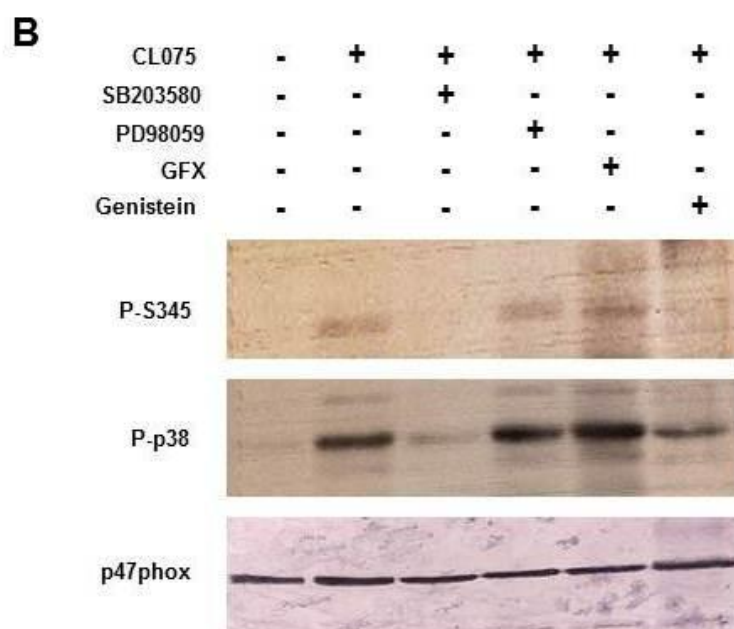
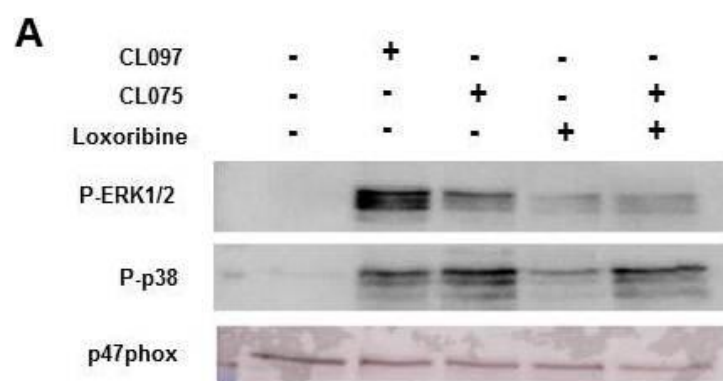


Figure 4

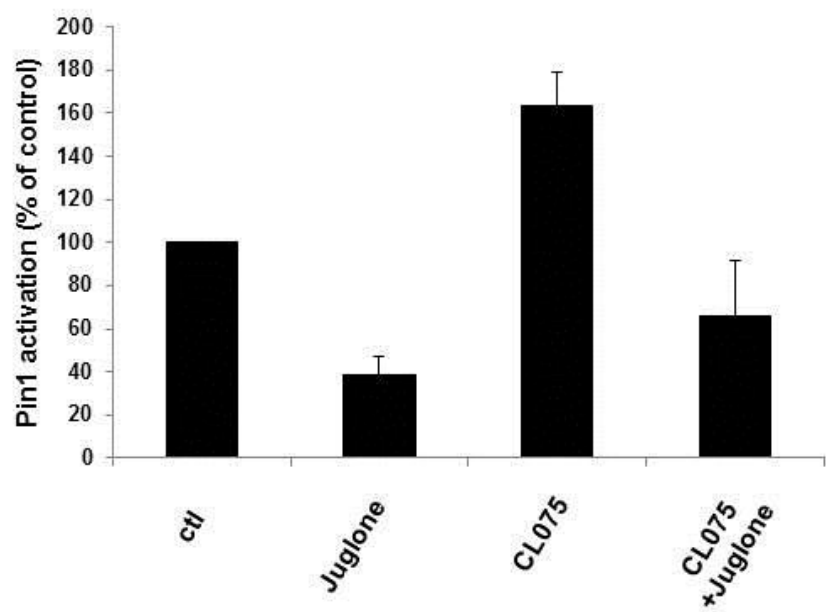
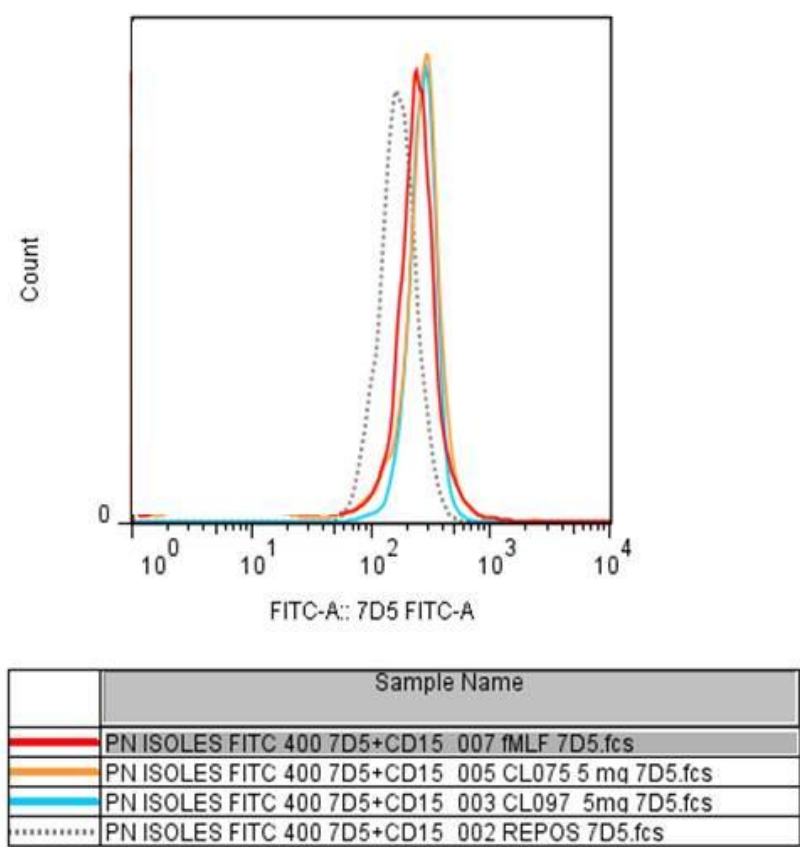


Figure 5



## **Article 2**

**Article 2 : Le Zymosan, une préparation des parois de *Saccharomyces cerevisiae*, induit l'activation de la NADPH oxydase dans les neutrophiles humains en induisant la phosphorylation de la p47phox et l'activation de Rac2.**

Dans un deuxième travail, on s'est intéressé à étudier l'effet du **Zymosan non opsonisé, un agoniste de TLR2, sur l'activation de la NADPH oxydase**. Nos résultats montrent que le zymosan, induit seul une forte production des FRO mesurées par la technique de chimioluminescence amplifiée au luminol. Pour mieux comprendre les mécanismes induisant l'activation de la NADPH oxydase en réponse à cet agoniste, nous avons étudié l'effet du Zymosan sur la phosphorylation de la p47phox et l'activation de rac2. Les résultats obtenus montrent que le zymosan induit la phosphorylation de la p47 phox sur différentes sérines : les sérines 345, 328 et 315. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de kinases a montré que ces phosphorylations sont induites par les MAP-Kinases ERK1/2 et p38, une protéine tyrosine kinase et les PKC. Cette étude montre aussi que le Zymosan active la petite protéine cytosolique Rac2, nécessaire à l'activation de la NADPH oxydase. L'inhibition de la phosphorylation de la p47phox au niveau des trois sérines 345, 328 et 315 ainsi que de l'activation de Rac2 par la génistéine, suggère qu'une protéine tyrosine kinase contrôle en amont ces deux mécanismes. En conclusion, le zymosan induit l'activation de la NADPH oxydase dans les neutrophiles humains en phosphorylant la p47phox et en activant Rac2. Nos résultats suggèrent qu'une protéine tyrosine kinase et PI3kinase contrôlent la phosphorylation de la p47phox et l'activation de Rac2. La p38 MAPK, ERK1/2 et PKC sont impliquées dans la phosphorylation de la p47phox dans les PN stimulés par le zymosan.

**Karama Makni-Maalej, Mélanie Chiandotto, Marie-Anne Gougerot-Pocidalo, Pham My-Chan Dang and Jamel El-Benna. Article 2: Zymosan a cell-wall preparation from *Saccharomyces cerevisiae* induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2. (Article soumis)**

**Zymosan a cell-wall preparation from *Saccharomyces cerevisiae* induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2.**

**Karama Makni-Maalej<sup>a,b</sup>, Mélanie Chiandotto<sup>a,b</sup>, Margarita Hurtado-Nedelec<sup>a,b,c</sup>, Marie-Anne Gougerot-Pocidalo<sup>a,b,c</sup>, Pham My-Chan Dang<sup>a,b</sup> and Jamel El-Benna<sup>a,b</sup>**

**Running title:** Zymosan induces neutrophil-ROS production

<sup>a</sup>INSERM, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon CRB3, Paris F-75018, France. <sup>b</sup>Université Paris 7 site Bichat, UMRS 773, Paris F-75018, France. <sup>c</sup>AP-HP, Centre Hospitalier Universitaire Xavier Bichat, UF Dysfonctionnements Immunitaires, Paris, F-75018.

Corresponding author: Dr. Jamel El-Benna, INSERM, U773, CRB3, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, Paris F-75018, France. Tél: 33 1 57 27 77 23, Email: [jamel.elbenna@inserm.fr](mailto:jamel.elbenna@inserm.fr)

Key words: Zymosan, neutrophil, NADPH oxidase, NOX2, p47phox, ROS: reactive oxygen species.

## Abstract

Reactive oxygen species (ROS) production by the neutrophil NADPH oxidase plays a key role in host defense against pathogens such as bacteria and fungi. Zymosan a cell-wall preparation from *saccharomyces cerevisiae* is largely used to activate neutrophils in its opsonized form. In this study, we show that non-opsonized zymosan induced ROS production by human neutrophils. Interestingly, zymosan induced the phosphorylation of the NADPH oxidase cytosolic component p47phox on Ser345, Ser328 and Ser315; and activation of the GTPase Rac2. Phosphorylation of p47phox as well as Rac2 activation were inhibited by genistein a broad range protein tyrosine kinase inhibitor. Wortmannin a PI3Kinase inhibitor, inhibited phosphorylation of p47phox on Ser328 and Ser315 and Rac2 activation. SB203580 and UO126, inhibitors of p38MAPK and ERK1/2-pathway respectively, inhibited phosphorylation of p47phox on Ser345. GF109203X a PKC inhibitor inhibited phosphorylation on Ser328 and Ser315. Zymosan-induced ROS production was inhibited by genistein, wortmannin, SB203580, UO126 and GF109203X. These results show that zymosan induced ROS production by NADPH oxidase in human neutrophils via the phosphorylation of p47phox and Rac2 activation. Our results also suggest that a protein tyrosine kinase and PI3Kinase control p47phox phosphorylation and Rac2 activation while p38MAPK, ERK1/2 and PKC are involved in zymosan-induced p47phox phosphorylation.



## Introduction

Human neutrophils, play a vital role in host defense against pathogens such as bacteria and fungi [1]. Upon infection, neutrophils migrate towards the infectious site attracted by chemoattractants [2]. Once at the infectious site, neutrophils recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), via transmembranar pattern recognition receptors such as toll-like receptors (TLR), which play an important role in innate immunity [3, 4]. Neutrophils then rapidly phagocytose the antibody- and complement-opsonized pathogen. Phagocytosis is accompanied by neutrophil activation, resulting in the release of proteolytic enzymes and antimicrobial peptides, and the massive production of reactive oxygen species (ROS) [5].

Neutrophil ROS production is controlled by the NADPH oxidase enzyme complex (also called NOX2) [6, 7]. This multi-component enzyme is dormant in resting cells and can be activated by various stimuli [8]. In its active form, the NADPH oxidase complex mediates the transfer of electrons from cytosolic NADPH to oxygen to produce superoxide anion. Superoxide is the precursor of other cytoxic ROS, such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and hypochlorous acid (HOCl), which are involved in microbial killing [9]. The NADPH oxidase consists of a membrane bound flavocytochrome b558 (composed of p22phox and gp91phox/NOX2) and four cytosolic subunits: p47phox, p67phox, p40phox, and Rac2 in human neutrophils [10, 11]. Activation of the NADPH oxidase is initiated by two simultaneous mechanisms ; the phosphorylation of p47phox on multiple sites and the activation of the small GTPase Rac2 followed by the migration of all the cytosolic components to the membrane where they associate with the membrane bound components to assemble the catalytically active oxidase [10]. Agonists such as the bacterial peptide fMLF and the pharmacological PKC activator PMA at micromolar concentrations strongly induce p47phox phosphorylation on several serines and NADPH oxidase activation. Proinflammatory agents such as cytokines (GM-CSF, TNF $\alpha$  and IL-8) alone induce a very weak oxidative response by neutrophils but strongly enhance ROS release upon exposure to a secondary stimulus such as fMLF [8]. This priming effect at the infectious site could facilitate the rapid elimination of the pathogen; however, excessive and uncontrolled priming could participate to the inflammatory reaction and thus be self-destructive [12, 13]. The priming effect has been shown to be controlled by the partial phosphorylation of p47phox [14-16], the activation of the proline isomerase Pin1 [17] and the translocation of the flavocytochrome b588 to the plasma membranes [18, 19].

Zymosan is an insoluble cell-wall preparation from the fungi *Saccharomyces cerevisiae*. Zymosan is largely used as a mimic of fungi to activate phagocytes such as neutrophils and monocytes especially in its opsonized form. Zymosan is mainly composed of beta-glucan, proteins, lipids and chitins [20], it is a known ligand for Dectin and TLR2 [21, 22] which are expressed in human neutrophils [23]. Zymosan have been described to exert a priming effect on fMLF-induced ROS production [23] and other studies showed that zymosan by itself induced ROS production in neutrophils and monocytes [24]. In this study, we show that

zymosan induced ROS production by inducing the phosphorylation of p47phox on specific sites and activation of Rac2. We further identified the pathways involved in these processes.

## **Experimental Procedures**

### *Reagents*

Zymosan, Luminol, protein kinase inhibitors, protease and phosphatase inhibitors, endotoxin-free buffers and salt solutions were from Sigma Chemical Co (Saint Louis, MO, USA). SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) and Western blotting reagents were purchased from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). The rabbit polyclonal antibodies against phospho-sites p47phox and p47phox have been described elsewhere (27).

### *Neutrophil preparation*

Circulating neutrophils were isolated from healthy volunteers by Polymorphprep™ (Axis Shield, Dundee, Scotland) gradient centrifugation [16, 17]. The neutrophil band was collected and the cells were washed in PBS and counted. Neutrophils were 96% pure and 99% viable.

### *ROS production assay*

ROS production was measured by the luminol-enhanced chemiluminescence method:  $5 \times 10^5$  human neutrophils were resuspended in 500  $\mu$ L of HBSS containing 10  $\mu$ mol/L luminol preheated to 37°C in the thermostated chamber of the luminometer (Biolumat LB937; Berthold). Zymosan was added at indicated concentration and chemiluminescence was recorded.

### *Rac2 activation assay*

Rac2 activation was measured using a previously described technique, with some modifications [25]. Briefly, neutrophils were stimulated with Zymosan and lysed directly by adding 2 x concentrated lysis buffer containing (20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2% NP40, 20% glycerol, 8 mM EGTA, 8 mM EDTA, 1 mM PMSF, 50 mg/ml aprotinin, 50 mg/ml leupeptin, 50 mg/ml pepstatin, 2 mM orthovanadate). The lysate was centrifuged for 10 min at 10000 rpm, 4°C. The resulting supernatant was then incubated with recombinant GST-PAK-RBD coupled to GSH beads for 40 min at 4°C. After several washing, the complex was recovered in 2x laemmli buffer and analyzed by SDS-PAGE and western blot using Rac-specific antibodies.

### *Western Blotting Analysis*

Neutrophils ( $15 \times 10^6$ ) in HBSS (400  $\mu$ L) were treated with zymosan for the indicated times and at the indicated concentrations at 37°C with mild shaking. The reaction was stopped by adding 5X concentrated Laemmli sample buffer [26] containing 5 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2.5 mmol/L p-NPP, 10 mmol/L NaF, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L EGTA, 20  $\mu$ g/ml leupeptin, 20  $\mu$ g/ml pepstatin and 20  $\mu$ g/ml aprotinin. Samples were then incubated for 2 min in boiling water (100°C) and stored at -80°C until use. Neutrophils lysates were sonicated and subjected to 10% SDS-PAGE (eq. of  $1 \times 10^6$  cells/well), using standard techniques [26]. The separated proteins were transferred to nitrocellulose [27], which was blocked with 5% milk in Tris-buffered saline containing Tween 20 (TBS-T) for 1 h. After blocking, the membranes were probed with the appropriate antibody, i.e., anti-phospho-Ser315-p47phox (1:2000), anti-phospho-Ser320-p47phox (1:2000), anti-phospho-Ser328-p47phox (1:2000), anti-phospho-Ser345-p47phox (1:10,000), anti-p47phox (1:5000), anti-phospho-p38 MAPK Thr180/Tyr182 (1:1000), anti-phospho-ERK1 (T202/204)/ERK2 (T185/Y187) (1:2000), followed by incubation with HRP-labeled goat anti-rabbit antibody (1:5000). The protein bands were revealed by using enhanced chemiluminescence (Santa Cruz, CA, USA).

### *Statistical analysis*

All results are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Significant differences ( $p < 0.05$ ) were identified with Student's t tests.

## Results

### *Zymosan induces ROS production by human neutrophils*

Opsonized zymosan is known to induce ROS production by neutrophils, but the effect of non opsonized zymosan on this function is less investigated. To investigate the effect of zymosan on neutrophil ROS production, neutrophils were incubated with several concentrations and ROS production was measured by luminol-amplified chemiluminescence. Results show (Fig. 1A and B) that zymosan (10-500 µg/ml) induced a clear increase of ROS production by neutrophils. The effect was concentration dependent with a maximum response obtained at 500 µg/ml, 1 mg/ml did not induce higher ROS production (data not shown). After a lag time of 8 min, the zymosan-effect was time-dependent to reach a plateau at 40 min (Fig. 1A).

### *Zymosan induces the phosphorylation of p47phox on specific sites*

Activation of the neutrophil NADPH oxidase by known neutrophil-agonists such as fMLF or PMA is accompanied by the phosphorylation of the p47phox regulatory subunit of NADPH oxidase, on several serines located in the C-terminal region (from Ser-303 to Ser-379) [10]. Thus, we examined whether zymosan-induced ROS production was associated with p47phox phosphorylation using specific anti-phosphoSer antibodies developed in our laboratory [17]. Interestingly, Western blotting analysis indicated that zymosan selectively induced a clear concentration-dependent phosphorylation of p47phox on three serines, Ser315, Ser328, and Ser345 and a weak but detectable phosphorylation on Ser320 (Fig. 2A and 2B). The zymosan-induced p47phox phosphorylation was time-dependent (Fig. 3A and 3B), with a time scale similar to that of the zymosan-induced ROS production.

### *Zymosan induces Rac2 activation*

Activation of the neutrophil NADPH oxidase by neutrophil-agonists such as fMLF or PMA is also accompanied by the activation of the small cytosolic Rac GTPase (20). Thus, we examined whether zymosan induced Rac2 activation using a GST-PAK-RBD/Rac2-GTP pull down assays. Results show that zymosan was able to induce Rac2 activation in human neutrophils in a time and concentration dependent manner (Fig 4 A and B).

### ***Effect of protein kinase inhibitors on zymosan-induced- p47phox phosphorylation, -Rac2 activation and –ROS production***

To identify the pathways involved in zymosan-induced p47phox phosphorylation and Rac2 activation, neutrophils were treated with different inhibitors. Results show (Fig 5), that genistein a broad range protein tyrosine kinase inhibitor, inhibited phosphorylation of p47phox on Ser345, 328 and 315 (Fig 5). Wortmannin a PI3Kinase inhibitor and GF109203X, a PKC inhibitor, inhibited phosphorylation of p47phox on Ser328 and Ser315 but not phosphorylation of Ser345. Results also show that pretreatment of neutrophils with SB203580, a p38MAPKinase inhibitor and UO126, a MEK1/2 (the upstream activator of ERK1/2) inhibitor resulted in the inhibition of zymosan-induced p47phox phosphorylation on Ser345 and partial inhibition of Ser315 phosphorylation (Fig. 5). PD09859, an other MEK1/2 inhibitor had the same inhibitory effect than UO126 (not shown).

Regarding Rac2 activation pathways analysis, results show (Fig 6), that pre-treatment of neutrophil by the broad range protein tyrosine kinase inhibitor genistein or the PI3Kinase inhibitor wortmannin, inhibited zymosan-induced Rac2 activation. However SB203580, a p38MAPKinase inhibitor and PD09859 a MEK1/2 (the upstream activator of ERK1/2) inhibitor and GF109203X a PKC inhibitor had no effect. UO126 also had no effect (data not shown).

To test the role of these pathways in zymosan-induced ROS production, neutrophils were incubated in the absence or presence of inhibitors for 30 min, then stimulated with zymosan. Results show that, pre-treatment of neutrophils with genistein or wortmannin almost completely inhibited zymosan-induced ROS production (Fig 7). Pre-treatment of neutrophils with GF109203X, SB203580 and UO126 partially inhibited ROS production.

## Discussion

In the present study, we have shown that zymosan induced NADPH oxidase activation in human neutrophils. We also show that zymosan induces the phosphorylation of the cytosolic NADPH oxidase subunit p47phox on Ser315, Ser328 and Ser345 along with the activation of the small cytosolic GTPase Rac2. Our results also suggest that p38MAPKinase and ERK1/2 converge to phosphorylate Ser345, PKC is involved in the phosphorylation of Ser328 and Ser315. Phosphorylation of p47phox and activation of Rac2 could be controlled by a common upstream protein tyrosine kinase which was inhibited by genistein, and by PI3Kinase as suggested by the effect of wortmannin. Moreover, our results show that inhibition of these pathways resulted in the inhibition of zymosan-induced ROS production by human neutrophils.

Zymosan is a known ligand for Dectin receptor and for TLR2 [20-24]. Recently it was shown that Dectin-1 is the major PRR receptor responsible for zymosan-induced NADPH oxidase activation in human monocytes [24]. Dectin-1 is highly expressed in human neutrophils and its specific ligand can induce ROS production [28, 29]. The role of Dectin-1 in zymosan-induced NADPH oxidase activation in human neutrophils needs to be confirmed.

NADPH oxidase activation and regulation is controlled by the phosphorylation of its cytosolic component p47phox on serines located between Ser303 and Ser379 [10]. It is clear that stimulation of neutrophils by high concentrations of the chemotactic peptide fMLF or by the PKC agonist PMA induces complete phosphorylation of p47phox [10]. Treatment of neutrophils with priming agents such as the proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$  and GM-CSF) induces partial phosphorylation of p47phox on Ser345, a MAP Kinase phosphorylation site [16]. Phosphorylation of p47phox on Ser345 is a critical mechanism in GM-CSF- and TNF $\alpha$ -induced priming of fMLF-induced ROS production by neutrophils as it enhances fMLF-induced p47phox phosphorylation on other sites (Ser315, 320, 328) [17]. The signaling pathways stimulated by zymosan in neutrophils are poorly understood compared to opsonized zymosan. In human monocytes, Elson and colleagues have shown that zymosan is able to activate PKC $\delta$  and the protein tyrosine kinases Syk and Src [24]. We have previously shown that PKC $\delta$  phosphorylates p47phox *in vitro* [30]. The results reported here by using a broad range PKC inhibitor, further suggest that PKC $\delta$  or an other PKC isoform is involved in zymosan-induced NADPH oxidase activation by phosphorylating p47phox on Ser315 and Ser328. We also showed that the p38MAPKinase inhibitor and the MEK1/2 inhibitor inhibited the phosphorylation of p47phox on Ser345. This site is a MAPKinase phosphorylation site which can be phosphorylated by *in vitro* by these kinases. In human neutrophils p38MAPKinase and ERK1/2 can converge to phosphorylate this site. We verified that p38MAPKinase and ERK1/2 are indeed both activated by zymosan in human neutrophils (data not shown), and thus they could phosphorylate p47phox on Ser345.

Genistein, a broad range protein tyrosine kinase inhibitor, inhibited phosphorylation of all p47phox serines. These results suggest that engagement of Dectin in human neutrophils induces several pathways involved in p47phox phosphorylation; p38MAPK and ERK1/2

converge to phosphorylate Ser345, PKC is involved in Ser328/Ser315 phosphorylation and an upstream protein tyrosine kinase controls these pathways. Syk and Src kinase which are activated by zymosan are also inhibited by genistein could control the p47phox phosphorylation cascades.

Rac2 activation is necessary to NADPH oxidase activation in human neutrophils. We show here that zymosan, in addition to inducing p47phox phosphorylation, it induced Rac2 activation. The data also suggest that an upstream protein tyrosine kinase (probably Syk or/and src kinase) and PI3Kinase control these Rac2 activation.

The results presented in this manuscript clearly show that zymosan induced neutrophil NADPH oxidase activation and p47phox phosphorylation on selective sites (Ser345, 328 and 315). The results also show that zymosan induced Rac2 activation in human neutrophils and suggest that a protein tyrosine kinase, PI3K, PKC, p38MAPKinase and ERK1/2 are involved in zymosan-induced ROS production by human neutrophils.

## **Acknowledgments**

We thank Dr Martine Torres for critically reading this manuscript.

## References

1. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006;6:173-182.
2. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, and Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 2000;80:617-653.
3. Kawai T, and Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-384.
4. Kumar H, Kawai T, and Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;388:621-625.
5. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect* 2003;5:1299-1306.
6. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999;93:1464-1476.
7. Groemping Y, and K Rittinger. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* 2005;386:401-416.
8. El-Benna J, Dang PMC, and Gougerot-Pocidalo MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol* 2008;30:279-289.
9. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 2007; 219:88-102.
10. El-Benna J, Dang PMC, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC, and Braut-Boucher F. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med* 2009;41:217-225.
11. El-Benna J, Dang PMC, Gougerot-Pocidalo MA, and Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005;53:199-206.
12. Jacobi J, Sela S, Cohen HI, Chezar J, and Kristal B. Priming of polymorphonuclear leukocytes: a culprit in the initiation of endothelial cell injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H2051-2058.
13. Conner WC, Gallagher CM, Miner TJ, Tavaf-Motamen H, Wolcott KM, and Shea-Donohue T. Neutrophil priming state predicts capillary leak after gut ischemia in rats. *J Surg Res* 1999;84:24-30.



14. Dang PM, Dewas C, Gaudry, Fay M, Pedruzzi, Gougerot-Pocidalo MA, and El Benna J. Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47(phox). *J Biol Chem* 1999;274:20704-20708.
15. Dewas C, Dang PMC, Gougerot-Pocidalo MA, and El-Benna J. TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 2003;171:4392-4398.
16. Dang PMC, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, Hayem G, Jensen ON, Gougerot-Pocidalo MA, and El-Benna J. A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest* 2006;116:2033-2043.
17. Boussetta, T., M. A. Gougerot-Pocidalo, G. Hayem, S. Ciappelloni, H. Raad, R. Arabi Derkawi, O. Bournier, Y. Kroviarski, X. Z. Zhou, J. S. Malter, P. K. Lu, A. Bartegi, P. M. Dang, and J. El-Benna. 2010. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood* 116:5795-5802.
18. DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP, and Nauseef WM. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest* 1998;101:455-463.
19. Ward RA, Nakamura M, and McLeish KR. Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 mitogen-activated protein kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome b558-containing granules. *J Biol Chem* 2000;275:36713-36719.
20. Dostert C, Tschopp J. DETeCTINg fungal pathogens. *Nature Immunology* 2007;8:17-18.
21. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, Haynes K, Steele C, Botto M, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* 2007;8:31-38.
22. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 2003;197:1107-1117.
23. Hayashi F, Means TK, and Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003;102:2660-2669.
24. Elson DH, Yakubenko VP, Roome T, Thiagarajan PS, Bhattacharjee A, Yadav SP, Cathcart MK. Protein kinase C  $\delta$  is a critical component of Dectin-1 signaling in primary human monocytes. *J Leukoc Biol* 2011;90:599-611.

25. Benard V, Bohl BP, Bokoch GM. Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J Biol Chem* 1999;274:13198-13204.
26. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
27. Towbin H, Staehelin T, and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4354.
28. Willment JA, Gordon S, Brown GD. Characterization of the human beta –glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* 2001;276:43818-43823.
29. Lavigne LM, Albina JE, Reichner JS. Beta-glucan is a fungal determinant for adhesion-dependent human neutrophil functions. *J Immunol* 2006;177:8667-8675.
30. Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 2002;41:7743-7750.

## Figure legends

**Fig.1. Zymosan induces ROS production by human neutrophils.** (A) Neutrophils were pretreated with different concentrations of zymosan (10, 50, 100, 250 and 500 µg/ml) at 37°C in Hanks buffer containing 10 µmol/L luminol and chemiluminescence was measured by a chemiluminometer; (B) Results are expressed as mean ± SEM (n = 3) (n=4, \*\*p<0.01).

**Figure 2. Zymosan induces phosphorylation of p47phox on specific sites in a concentration-dependent manner.** (A) Neutrophils ( $15 \times 10^6$  cells/ml) were incubated with various concentrations of Zymosan (10, 50, 100, 250 and 500 µg/ml) for 30 min. Cells were lysed, and proteins from  $1.5 \times 10^6$  cells were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-phospho-Ser345, anti-phospho-Ser328, anti-phospho-Ser320, anti-phospho-Ser315 or anti-p47phox antibody (p47phox); (B) Western blots from different experiments were scanned; phosphorylated and total p47phox were quantified by densitometry, and the intensity of phosphorylated p47phox was corrected for the protein amount of p47phox. Results are expressed as mean ± SEM (n = 3, \*\*p<0.01).

**Figure 3. Zymosan induces phosphorylation of p47phox on specific sites in a time-dependent manner.** (A) Neutrophils ( $15 \times 10^6$  cells/ml) were incubated with Zymosan (500µg/ml) for the indicated times (0, 15, 30, 45 and 60 min). Cells were lysed, and proteins from  $1.5 \times 10^6$  cells were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-phospho-Ser345, anti-phospho-Ser328, anti-phospho-Ser320, anti-phospho-Ser315antibodies or anti-p47phox antibody (p47phox). (B) Western blots from different experiments were scanned;

phosphorylated and total p47phox were quantified by densitometry, and the intensity of phosphorylated p47phox was corrected for the amount of p47phox. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=4, \*\*p<0.01).

**Figure 4. Zymosan induces Rac2 activation in human neutrophils.** (A) Neutrophils were stimulated with zymosan (500 $\mu$ g/ml) for the indicated times (0, 2, 5, 10 and 20 min) or different concentrations of zymosan (0-1.5 mg/ml) for 30 min. Cells were lysed, and GTP-Rac2 was immunopurified using the RBD-PAK2 binding assay. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using an anti-Rac2 antibody.

**Figure 5. Effects of protein kinase inhibitors on zymosan-induced p47phox phosphorylation.** Human neutrophils were pre-incubated at 37°C for 30 min with protein kinase inhibitors: Genistein (100  $\mu$ M), Wortmanin (100 nM), GF109203X (5  $\mu$ M), SB203580, (10  $\mu$ M) and UO126 (10  $\mu$ M). Zymosan (500 $\mu$ g/ml) was added for 30 min, proteins were denatured for SDS-PAGE and Western blotting analysis using an anti-phosphorylated Ser345 antibody (P-Ser345) or an anti-phosphorylated Ser328 antibody (P-Ser328) or an anti-phosphorylated Ser315 antibody (P-Ser315) or an anti-p47phox antibody. Representative of 3 experiments.

**Figure 6. Effects of protein kinase inhibitors on zymosan-induced Rac2 activation.** Human neutrophils were pre-incubated at 37°C for 30 min with protein kinase inhibitors: Genistein (100  $\mu$ M), Wortmanin (100 nM), GF109203X (5  $\mu$ M), SB203580, (10  $\mu$ M) and PD109203X (50  $\mu$ M). Zymosan (500 $\mu$ g/ml) was added for 30 min, cells were lysed, and

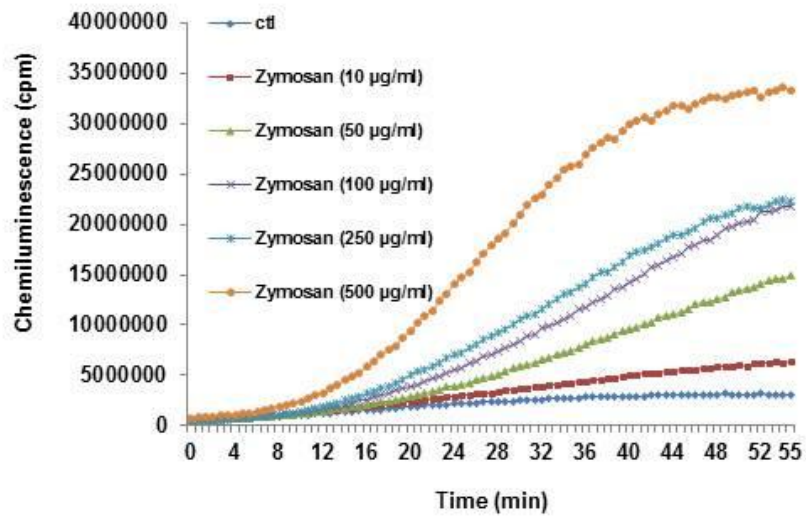
GTP-Rac2 was immunopurified using the RBD-PAK2 binding assay. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using an anti-Rac2 antibody. Representative of 3 experiments.

**Figure 7. Effects of protein kinase inhibitors on zymosan-induced ROS production.**

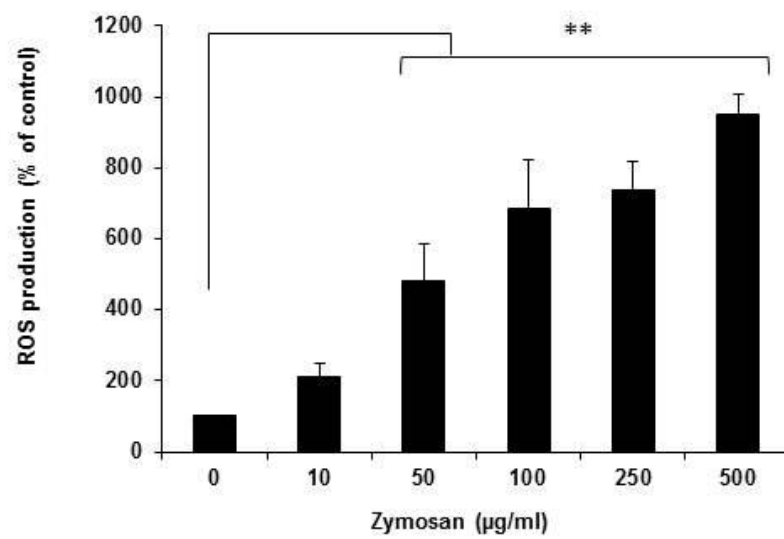
Human neutrophils were pre-incubated at 37°C for 30 min with protein kinase inhibitors: Genistein (100  $\mu$ M), Wortmanin (100 nM), GF109203X (5  $\mu$ M), SB203580, (10  $\mu$ M) and UO126 (10  $\mu$ M) in Hanks buffer containing 10  $\mu$ mol/L luminol. Zymosan (500  $\mu$ g/ml) was added and chemiluminescence was measured by a chemiluminometer. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3) (n=4, \*<0.05, \*\*p<0.01).

Figure 1

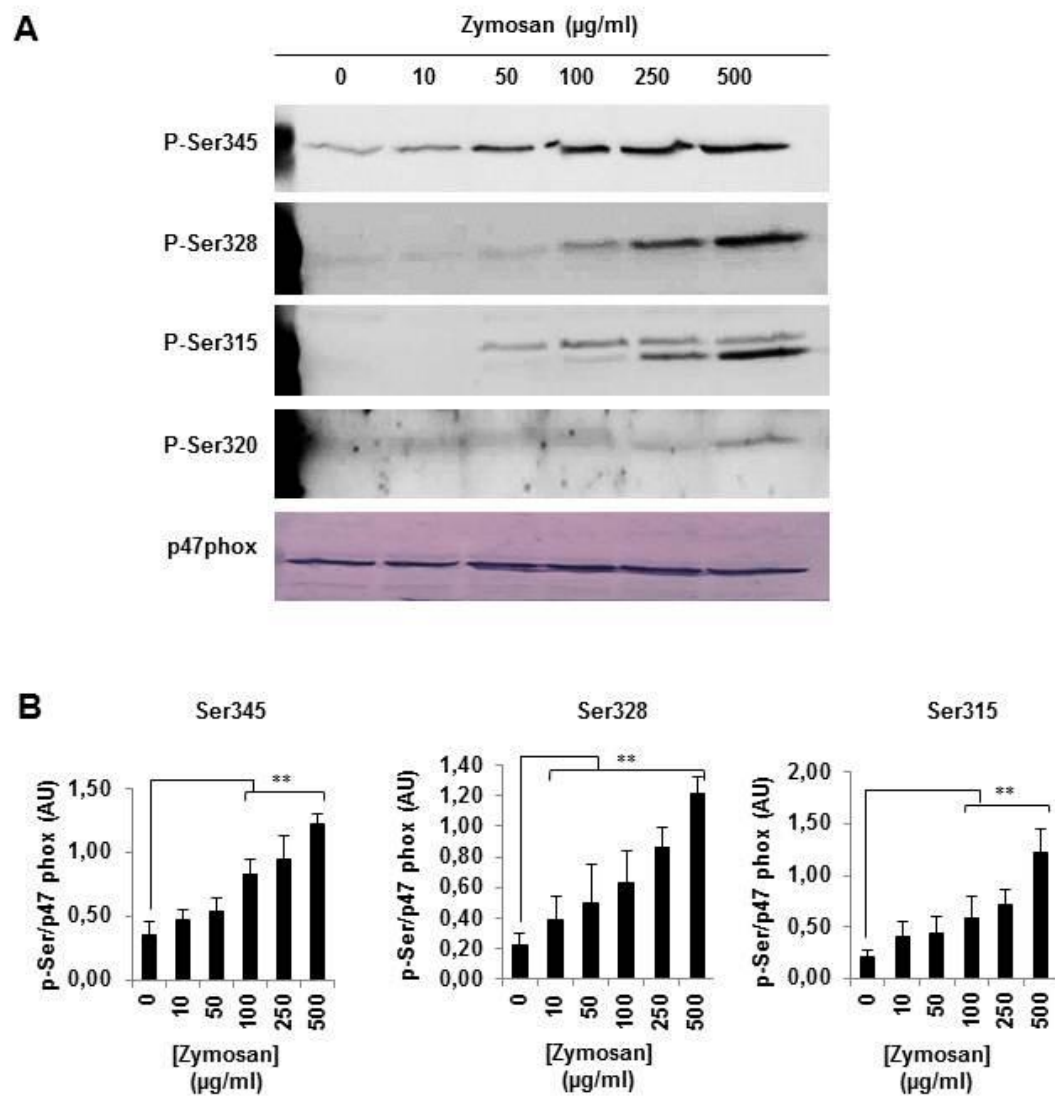
**A**



**B**

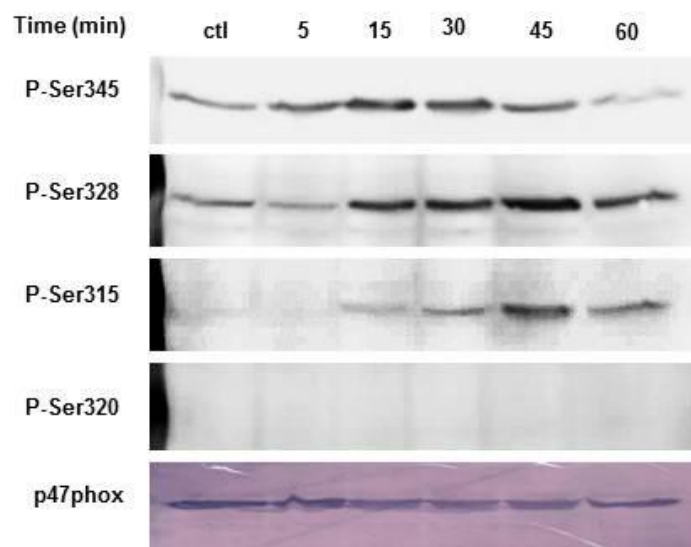


**Figure 2**

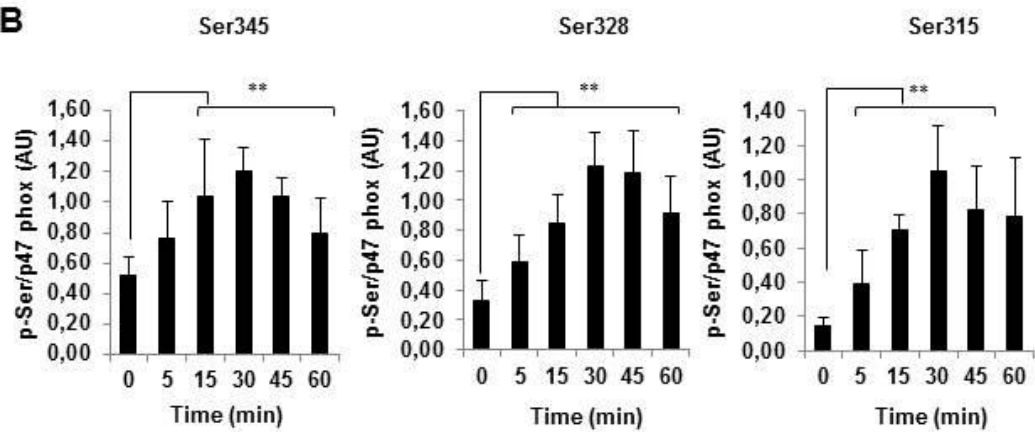


**Figure 3**

**A**

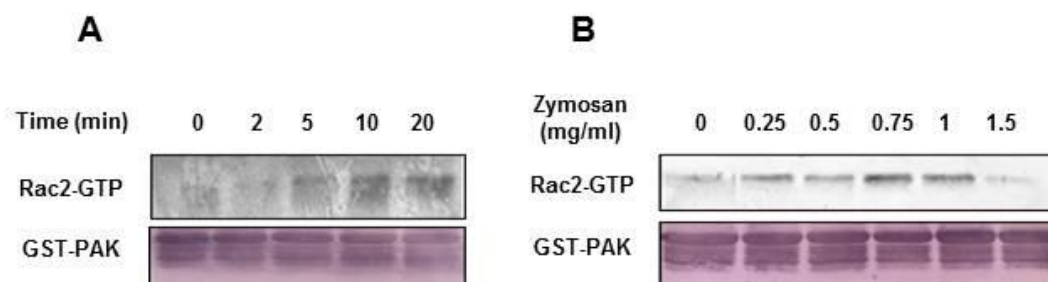


**B**

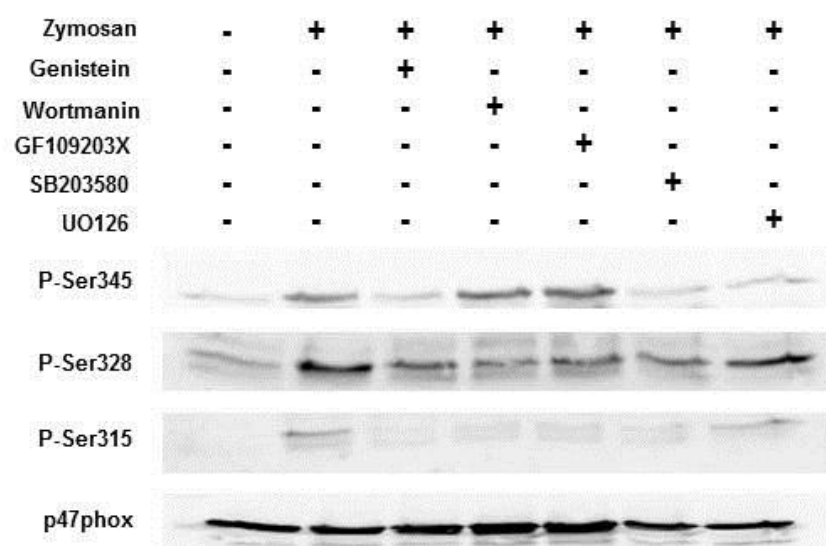




**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

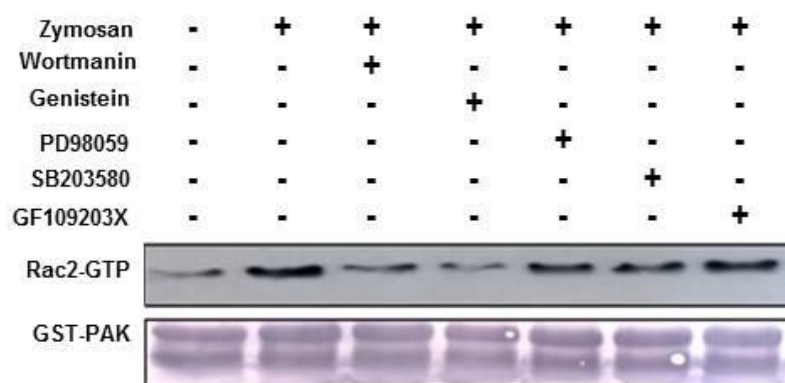
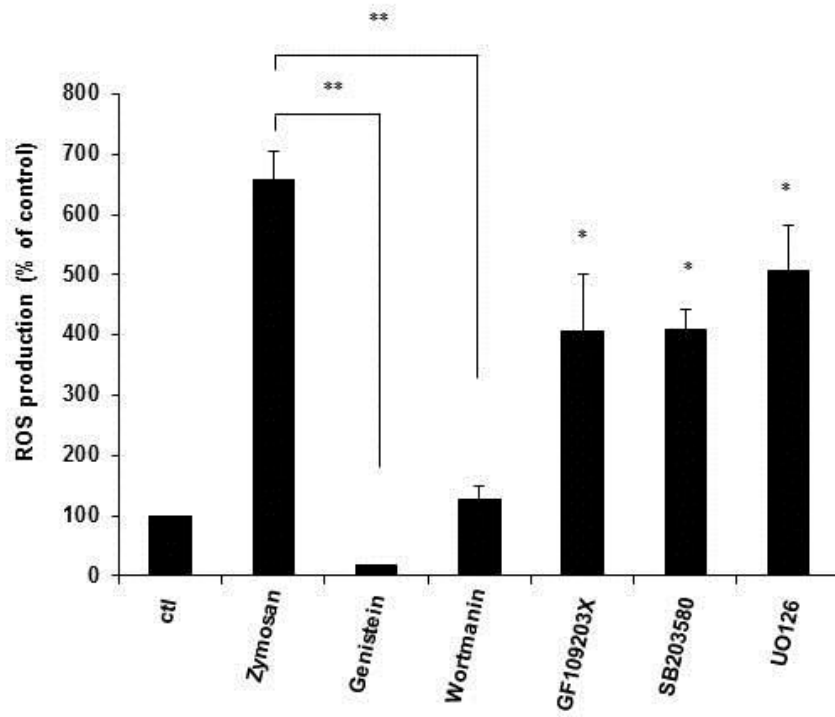


Figure 7



## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## DISCUSSION

Les polynucléaires neutrophiles humains (PN) sont des cellules clé de l'immunité innée et de l'inflammation. Ce sont les premières cellules immunitaires à migrer du sang circulant vers le foyer infectieux ou inflammatoire. Arrivé sur le site le PN reconnaît sa cible par différents moyens dont les récepteurs de reconnaissance pour des motifs conservés au cours de l'évolution de l'agent pathogène (« Pattern Recognition Receptor »- PRR) dont les « Toll-like receptors » ou TLR. Cette reconnaissance de motifs des agents pathogènes conservés au cours de l'évolution (« Pathogen associated Molecular Patterns »- PAMPs) ou de molécules provenant de cellules endommagées (« Damage Associated Molecular Patterns » ou « Danger Associated Molecular Patterns ») joue un rôle critique dans l'activation des PN et l'engagement de leurs différentes propriétés effectrices.

Une propriété effectrice majeure du PN est la production rapide et massive de l'anion superoxyde source des autres formes réactives de l'oxygène (FRO), par le système enzymatique multimoléculaire, la NADPH oxydase. L'activation de cette enzyme nécessite la translocation des protéines cytosoliques (p40phox, p47phox, p67phox et Rac2) (phox: pour phagocyte oxidase) vers le cytochrome b558 formé de deux protéines membranaires (gp91phox ou NOX2 et p22phox). Ce processus est régulé par des signaux transductionnels, des réactions de phosphorylation/déphosphorylation et des interactions protéine/protéine. Ces mécanismes d'activation sont dépendants de l'environnement cellulaire notamment de la présence de différents médiateurs de l'inflammation et de l'expression de leurs récepteurs par les PN. Les FRO produites par la NADPH oxydase phagocytaire sont essentielles à la défense contre les agents pathogènes. Cependant, si elles sont produites de façon excessive et mal contrôlée, elles peuvent être délétères pour les tissus environnants. Des données récentes suggèrent que les FRO peuvent participer à la physiopathologie de certaines maladies inflammatoires aiguës ou chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR), le syndrome de détresse respiratoire aiguë de l'adulte (ARDS), le syndrome d'ischémie reperfusion, l'athérosclérose ou encore l'asthme (El Benna, 2008).

L'activation de la NADPH oxydase des phagocytes peut être induite par un grand nombre de facteurs solubles et particuliers comme les N-formyl peptides d'origine bactérienne tel le formyl-Méthionine-Leucine-Phénylalanine (fMLF), le phorbol myristate acétate (PMA), le zymosan opsonisé, des bactéries opsonisées... De plus, l'activité NADPH

oxydase induite par ces facteurs peut être augmentée par un prétraitement des PN avec des agents “ primants ” comme les cytokines pro-inflammatoires (GM-CSF, TNF $\alpha$  et IL-8) (El Benna, 2008). Ces cytokines n’induisent pas la production des FRO par elles-mêmes mais augmentent fortement leur production en réponse à un deuxième stimulus appliqué ultérieurement, préparant ainsi la cellule pour une réponse plus rapide et plus efficace. Ces phénomènes de “priming” ou d’amorçage de l’explosion oxydative semblent jouer un rôle important *in vivo* dans la régulation physiologique de la microbicidie mais aussi dans l’induction de lésions tissulaires au cours de certaines pathologies inflammatoires. Si ces phénomènes sont bien décrits *in vitro* et *in vivo*, leurs mécanismes moléculaires sont encore mal connus. Les travaux de notre équipe ont montré que le GM-CSF et le TNF $\alpha$  induisent la phosphorylation de la p47phox sur la Ser345 présente au sein d’un site consensus pour les MAPKinases. Ce site est phosphorylé par les MAPK, ERK1/2 dans les PN traités par le GM-CSF et p38 MAPK dans les PN traités par le TNF $\alpha$  (Dang et al., 2006). Ces résultats suggèrent que différentes MAPK convergent pour phosphoryler la Ser345. Ce site phosphorylé pourrait correspondre à un site de « priming » de la NADPH oxydase phagocytaire sous l’influence de certaines cytokines proinflammatoires. De plus notre équipe a montré que le TNF $\alpha$  induit une liaison entre la p47phox et la proline isomérase Pin1 via la Ser345 phosphorylée. Pin1 induit un changement de conformation de la p47phox et pourrait faciliter, en réponse à un second stimulus, sa phosphorylation totale par les PKC et sa translocation vers la membrane (Boussetta et al., 2010), augmentant ainsi la production de FRO.

Les TLR sont des récepteurs exprimés dans de nombreuses cellules dont les cellules immunitaires et notamment les PN. Les PN expriment les TLR de 1 à 10 sauf le TLR3 (Hayashi et al., 2003). L’expression des TLR n’est pas statique et peut être modulée rapidement en réponse aux pathogènes, à différentes cytokines et aux stress de l’environnement. Ainsi, l’expression du TLR2 par les PN, est augmentée par les cytokines pro-inflammatoires et par l’exposition à de multiples bactéries (Kurt-Jones et al., 2002). Les TLR sont exprimés dans différents compartiments cellulaires. En effet, alors que certains TLR (TLR 1, 2, 4, 5, 6) se retrouvent à la surface cellulaire d’autres (TLR 3, 7, 8, 9) sont présents exclusivement dans les compartiments intracellulaires tels que les endosomes. Dans ce cas, leurs ligands, principalement des acides nucléiques issus des agents pathogènes, requièrent l’internalisation dans les endosomes avant que toute signalisation ne soit possible. Il est

important de rappeler que la grande majorité des études ont étudié les niveaux d'ARNm et non pas les protéines exprimées. Ceci pourrait expliquer qu'un type cellulaire exprime l'ARN de plusieurs TLR et ne réponde qu'aux ligands de quelques-uns seulement.

Quelques agonistes des TLR comme le LPS (DeLeo et al., 1998), agoniste de TLR4 ont été décrits pour induire un priming de la production des FRO par les PN. L'action de certains agonistes des TLR7/8 tel le R848, était discutée ; certains décrivant un effet de priming, d'autres un effet activateur direct de la NADPH oxydase. De plus, les mécanismes moléculaires mis en jeu n'étaient pas connus.

Notre objectif de thèse portait sur l'étude de l'effet des agonistes des TLR sur la production des FRO par les PN de sujets sains et les mécanismes moléculaires impliqués. Au début de notre étude nous avons voulu comparer l'effet de plusieurs agonistes des TLR sur la production des FRO. Les résultats que nous avons trouvés, suggéraient que certains de ces agonistes comme le LPS (TLR4), LTA (TLR2 et 6), flagelline (TLR5), R848 (TLR7 et 8), CL097 (TLR7 et 8) et l'imiquimode (TLR7) induisent a des niveaux variables le priming de la production des FRO secondairement à la stimulation ultérieure des PN par le peptide bactérien, le fMLF et que le meilleur priming a été obtenu avec l'agoniste des TLR7 et 8, le CL097.

### **1- Effets des agonistes de TLR 7/8 sur le priming de la production des FRO par le polynucléaire neutrophile humain.**

Dans un premier temps nous avons donc décidé d'étudier les effets des agonistes des TLR7/8 sur le priming de la NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles humains. Les gènes codant pour ces deux TLR présentent une forte homologie. Le TLR7 murin et le TLR8 humain reconnaissent des composés antiviraux synthétiques appelés imidazoquinoline (R848, CL097) et certains analogues de nucléotides de guanine (Loxoribine) (Hemmi et al., 2002 ; Diebold et al., 2004). Plusieurs virus enveloppés transitent dans le cytosol via les compartiments endosomaux. Le phagolysosome est un environnement hautement acidifié qui contient plusieurs enzymes de dégradation qui peuvent endommager les particules virales menant à la libération d'ARN simple-brin et à la reconnaissance par les TLR 7 et 8. Ces deux récepteurs exprimés dans les membranes endosomales, sont capables de reconnaître des régions riches en uridine et guanosine du VIH-1, virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et virus de l'influenza. Les PN expriment l'ARNm de tous les TLR à l'exception du TLR3.



L'expression du TLR7 dans les PN était discutée : L'ARNm du TLR7 a été identifié dans les PN mais la révélation de la protéine par des anticorps spécifiques en western blot n'aboutissait pas à des résultats convaincants. D'autres études ont montré que l'expression du TLR7 dans les PN est considérée faible par rapport aux autres TLR (Hayashi et al, 2003). Nous avons montré par western blot avec des anticorps spécifiques l'expression des deux TLR7 et 8 dans les PN humains.

Le CL097, un dérivé du R848 et agoniste des TLR7/8, induit divers effets sur la réponse immunitaire tels que la stimulation de la production des cytokines proinflammatoires et de l'interféron de type I mais son effet sur le priming de la production des FRO par les PN humains n'était pas connu au début de ce travail. Nous avons clairement montré que le CL097 seul n'induisait pas de production de FRO par les PN humains mais il induisait un priming de cette réponse dépendant du temps et de la concentration.

La production excessive des FRO générée dans les sites infectieux par les PN, participe à la physiopathologie de certaines maladies inflammatoires. L'exacerbation de la production des FRO en réponse à une infection virale est associée à l'activation des TLR. En effet le prétraitement des PN par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente leur capacité à produire l'IL-8, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF $\alpha$  ainsi que la production des FRO en réponse au R848 (Yanagisawa et al, 2009). La combinaison de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de R848 potentialise significativement la phosphorylation de NF- $\kappa$ B et la dégradation d'IKB $\alpha$ . Ces résultats suggèrent que le stress oxydatif peut potentialiser la réponse inflammatoire par les PN durant une infection virale en stimulant la production de chimiokines attirant les PN, celles de cytokines participant à leur activation et en amplifiant la production des FRO.

## **2-Les mécanismes moléculaires impliqués dans le priming de la production des FRO par la NADPH oxydase des PN induit par le CL097.**

Les mécanismes moléculaires impliqués dans le priming de la production des FRO par la NADPH oxydase des PN induit par le CL097 et les autres agonistes du TLR8 n'avaient pas été étudiés. Nos résultats ont montré que le CL097 induisait la phosphorylation de la sous-unité cytosolique de la NADPH oxydase la p47phox sur les Ser345, Ser328 et Ser315. Le traitement des PN par un deuxième stimulus le fMLF augmentait considérablement la phosphorylation de la Ser328 et la Ser315 mais pas celle de la Ser-345. Nos résultats ont suggéré que les MAPK ERK1/2 et p38MAPKinase, sont impliquées dans la phosphorylation

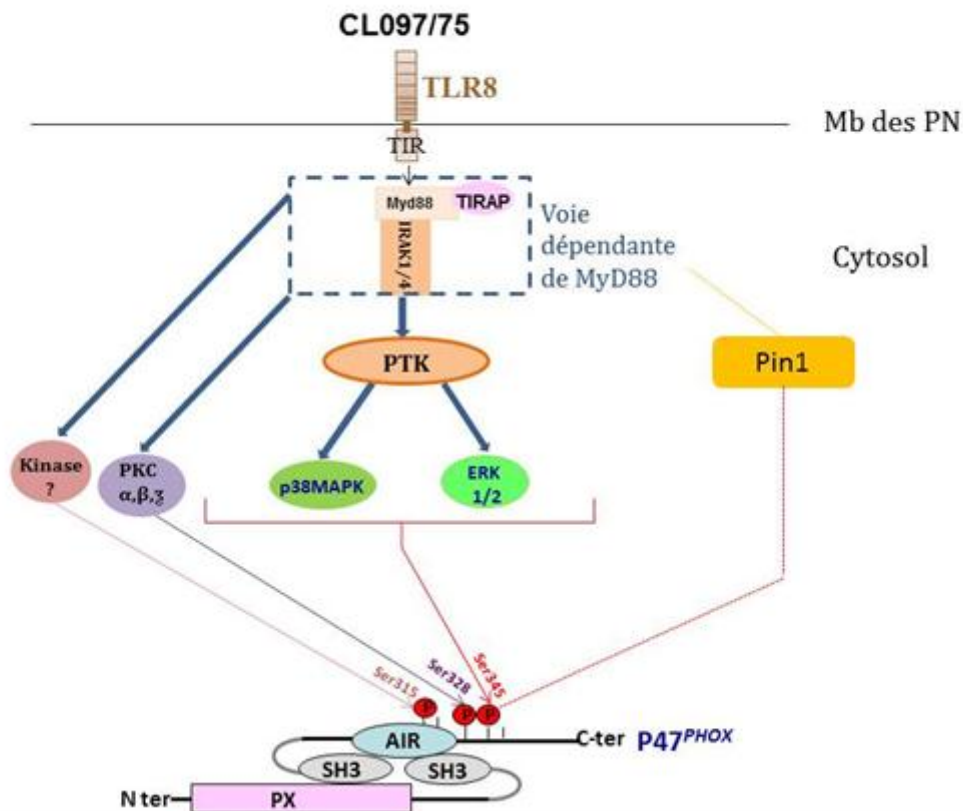
de la Ser345. Les PKC sont impliquées dans la phosphorylation de la Ser328, en revanche les kinases susceptibles de phosphoryler la Ser315 ne sont pas encore identifiées. D'autres inhibiteurs de kinase seront testés sur la phosphorylation de la p47phox dans la suite de ce travail. Ces voies de signalisation sont contrôlées en amont par une tyrosine kinase car leur activation est inhibée par la génistéine. L'activation de ces MAPK par des agonistes de TLR7/8 a été observée dans d'autres cellules telles que les monocytes, les lymphocytes et les cellules dendritiques, dans lesquelles, cette voie a induit la translocation du facteur de transcription NFκB qui contrôle la production des cytokines proinflammatoires en utilisant la voie MyD88 (Butchi et al., 2008 ; Smits et al., 2008). Parallèlement, il a été montré que l'activation de la voie MyD88 par ces mêmes agonistes, induisait l'activation d'IRF7 et donc la production d'interféron de type I, un activateur potentiel de la défense antivirale. Les mécanismes induisant ces phénomènes sont aussi variables et complexes. En effet, dans notre étude nous avons suggéré que le priming de la production des FRO par les PN en réponse au CL097, est bien lié à l'activité de plusieurs protéines kinases induisant la phosphorylation de la p47phox, mais nous avons trouvé aussi qu'une proline isomérase Pin1 joue un rôle dans cette phosphorylation. En effet le CL097 induit l'activation de Pin1 dans les PN humains. L'inhibition de Pin1 par son inhibiteur « Juglone », inhibait l'effet primant du CL097 sur la phosphorylation des Serines 328 et 315 de la p47phox, et sur la production des FRO. En se basant sur des travaux antérieurs de notre équipe (Boussetta et al, 2010), nos résultats obtenus sur Pin1, suggèrent que la phosphorylation initiale de la Ser345 induite par le CL097 entraînerait le recrutement de Pin1 activée, qui en se liant à la Ser345 phosphorylée, engendrerait un changement conformationnel de la p47phox, rendant les Serines 328 et 315 plus accessibles à d'autres kinases. Donc Pin1 est un facteur critique dans le priming de la NADPH oxydase et la production exacerbée des FRO par les PN traités par le CL097. Ce qui suggère que Pin1 peut agir comme un amplificateur de la phosphorylation de la p47phox et la production des FRO par les PN infiltrants les sites inflammatoires.

Par ailleurs, l'activation de la NADPH oxydase des PN nécessite la fusion des granules spécifiques et des vésicules sécrétoires contenant au repos, la plupart du cytochrome b558. Lors de l'activation des PN, les granulations fusionnent à la fois avec la membrane de la vacuole phagocytaire mais aussi avec la membrane plasmique (Morel et al., 1985). Nos résultats ont montré que le CL097 induit la translocation du cytochrome b558 aux membranes des PN, un autre évènement en faveur du priming de la production des FRO par les PN. Le

CL097 induirait donc le priming de la production de FRO par la NADPH oxydase des PN par différents mécanismes : d'une part des mécanismes de phosphorylation de différents sites de la p47phox associés à l'activation de la proline isomérase Pin1 qui induirait un changement conformationnel de la p47phox qui pourrait être responsable d'une translocation et d'une liaison plus rapide au cytochrome b558, d'autre part par l'induction d'une dégranulation augmentant l'expression du cytochrome b558 à la membrane plasmique ou phagosomale.

### **3- L'effet de chaque agoniste des TLR7 et TLR8 seul sur la production des FRO par les neutrophiles.**

Pour mieux comprendre la participation de chacun des TLR7 ou 8 dans le priming de la NADPH oxydase, nous avons testé l'effet du CL075 (agoniste spécifique du TLR8) et la Loxoribine (agoniste spécifique du TLR7). Les résultats montrent que le CL075 induit un priming de la production des FRO d'une façon comparable à celle obtenue par le CL097, alors que la Loxoribine n'a pas d'effet. Ces résultats suggèrent que l'effet de CL097 dépend du TLR8 mais pas du TLR7. La comparaison des effets des agonistes spécifiques des TLR7 et 8 sur la phosphorylation de la p47phox et l'activation de Pin1, montre que le CL075 (agoniste de TLR8) induit une phosphorylation de la p47phox au niveau des Serines 345, 328 et 315 et l'activation de Pin1 d'une façon comparable à celle obtenue avec le CL097, alors que la Loxoribine (agoniste de TLR7) n'a pas d'effet. De plus, le CL075 et non la loxoribine induit la translocation du cytochrome b558 à la membrane des PN. Ces résultats suggèrent que l'effet de CL097 dépend des voies de signalisations engagées par le TLR8 mais pas par le TLR7 (Figure 1). Parallèlement à nos résultats, l'étude de Hattermann montre que l'effet du R848 sur le priming de la biosynthèse des médiateurs lipidiques de l'inflammation par les PN, passe par le TLR8 (Hattermann et al, 2007).



**Figure 1 : Schéma des voies de signalisation déclenchées par l'activation du TLR8 par le CL097 ou le CL075.** Le TLR 8 active plusieurs voies : des tyrosines kinases, PKC, MAPKinases (p38 et ERK1/2) et Pin1 qui contrôlent la phosphorylation de la p47<sup>phox</sup>, sous-unité de la NADPH oxydase des neutrophiles.

#### 4-Effet des TLR7/8 sur les neutrophiles : physiologie et en physiopathologie.

Les PN détectent la présence des bactéries, champignons et virus via leurs TLR qui reconnaissent des PAMPs. L'ARN simple brin viral (ARNss) est l'agoniste naturel des TLR7 et TLR8 qui ont une expression intracellulaire (endosomale). Plusieurs virus, comme le virus Influenza, le VIH et le virus de la stomatite vésiculaire sont des virus à ARNss et ont été décrits en tant qu'activateurs des TLR7/8 (Diebold et al, 2004 et Schlaepfer et al, 2006). Le R848 est le ligand synthétique potentiel de TLR7/8 ; il a une action antivirale et antitumorale (Dockrell et al, 2001). Le traitement des PN humains avec ce ligand induit une production d'IL-8, augmente la phagocytose des billes de latex et un shedding robuste de la L-sélectine, fonctions importantes de la réponse immunitaire par les PN (Hayashi et al, 2003). Les travaux

effectués par Hattermann en 2007, montraient que le R848 est un agent primant potentiel pour la biosynthèse de trois classes des médiateurs lipidiques de l'inflammation dans les PN; le leucotriène B4 (LTB4), la prostaglandine E2 et le facteur d'activation plaquettaire PAF. Des études récentes ont montré le rôle important de LTB4 dans la défense contre les infections et dans la prévention de la réactivation du cytomégalo virus (CMV) (Gosselin et al, 2005). En effet l'administration intraveineuse de LTB4 induit la libération de peptides antimicrobiens, les  $\alpha$ -défensines (Flamand et al, 2004). Ces résultats suggèrent que la réponse antivirale induite par les ARNss viraux via les voies de signalisation des TLR7/8, implique les médiateurs lipidiques de l'inflammation. Le rôle crucial des agonistes de TLR7/8 (imidazoquinolines) dans la défense antivirale a été confirmé par Miller et Tomai (Miller et al., 2008 et Tomai et al., 1995). Par ailleurs, les travaux de Tariq Tajuddin ont montré que l'utilisation du CL097 durant le traitement de l'hépatite C par l'INF $\alpha$ , pourrait non seulement augmenter la production du G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor) en réduisant la neutropénie induite par l'INF chez les patients atteints d'hépatite C, mais aussi favoriser la réponse antivirale par les monocytes et les cellules dendritiques (Tajuddin et al., 2010). D'où l'idée de Miller et al, d'expérimenter l'effet thérapeutique du CL097 pour le traitement des infections par le virus de l'hépatite C. D'autres travaux ont montré que la costimulation des monocytes par le LPS (TLR4) et par le CL097 (TLR7/8), empêchait l'expression d'IRAK-M (IL-1 receptor-associated kinase M) et du Bcl-3 (B-cell leukemia 3), deux régulateurs négatifs de la signalisation via le TLR4. L'inhibition de ces deux protéines, est accompagnée d'une augmentation significative de production du TNF $\alpha$ , de l'IL-10 et de l'IL-12 dans le sang total des individus normaux, des patients atteints de sepsis et des patients atteints de cancer (Petricevic et al., 2009). Ces résultats pourraient ouvrir des perspectives pour une application thérapeutique des agonistes des TLR7/8 entre autres le CL097.

L'implication des TLR dans les processus inflammatoires n'est pas restreinte à la reconnaissance des ligands exogènes. Ainsi, la reconnaissance des ligands endogènes comme l'ADN et l'ARN du soi par les TLR, joue un rôle important dans la génération des maladies auto-immunes en particulier le LES (lupus érythémateux systémique). L'analyse du sérum des patients atteints de LES, révèle une forte production de l'INF $\alpha$  par les monocytes. Le taux élevé d'INF $\alpha$  dû à l'activation des TLR joue un rôle important dans la progression de la maladie. Les TLR7 et 9 sont les TLR majoritairement impliqués dans ce phénomène pathologique et sont exprimés par les lymphocytes B et les cellules dendritiques chez

l'homme (Hornung et al., 2002 ; Kadowaki et al., 2001). L'utilisation d'inhibiteurs de TLR7 et TLR9 est suggérée comme une stratégie pour traiter ce type de pathologie (Coffman et al., 2008).

## **5- Effet du Zymosan sur la production des FRO par la NADPH oxydase du polynucléaire neutrophile humain.**

L'observation initiale chez la drosophile révélant que les mouches déficientes pour le récepteur Toll étaient susceptibles aux infections fongiques, a suggéré que les TLR des mammifères pourraient également participer à l'immunité anti-fongique. Les TLR sont impliqués dans la reconnaissance de pathogènes fongiques tels que *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* et *Pneumocystis carinii* (Takeda et al., 2003 ; Netea et al., 2004). Plusieurs PAMPs fongiques sont situés dans les parois cellulaires ou sur la surface cellulaire des champignons et sont reconnus par le TLR2 ou le TLR4. Dectine-1 est une protéine transmembranaire de type II qui possède un domaine lectine de type C dans sa région extracellulaire et un motif ITAM dans son domaine intracellulaire. La Dectine-1 lie les  $\beta$ -glycans, composés majeurs du zymosan, et est le principal récepteur des macrophages pour la phagocytose de plusieurs champignons (Brown et al., 2002). Il a été démontré que la Dectine-1 peut collaborer avec le TLR2 en réponse aux levures et mener à une forte réponse inflammatoire via le recrutement de diverses protéines intracellulaires (Gantner et al., 2003 ; Underhill et al., 2005). Récemment, il a été montré que la Dectine-1 est le PRR responsable de l'activation de la NADPH oxydase induite par le zymosan dans les monocytes humains (Elsori et al., 2011). La Dectine-1 est fortement exprimée dans les PN humains, ces ligands spécifiques pourraient induire la production des FRO (Willment et al., 2001 et Lavigne et al., 2006). Cependant, le rôle de ce récepteur dans l'activation de la NADPH oxydase des PN par le zymosan n'était pas encore confirmé. Dans ce travail de thèse, nous avons étudié l'effet du zymosan, sur l'activation de la NADPH oxydase des neutrophiles. Cette étude a montré que cet agoniste non opsonisé, induit, seul, une forte production des FRO.

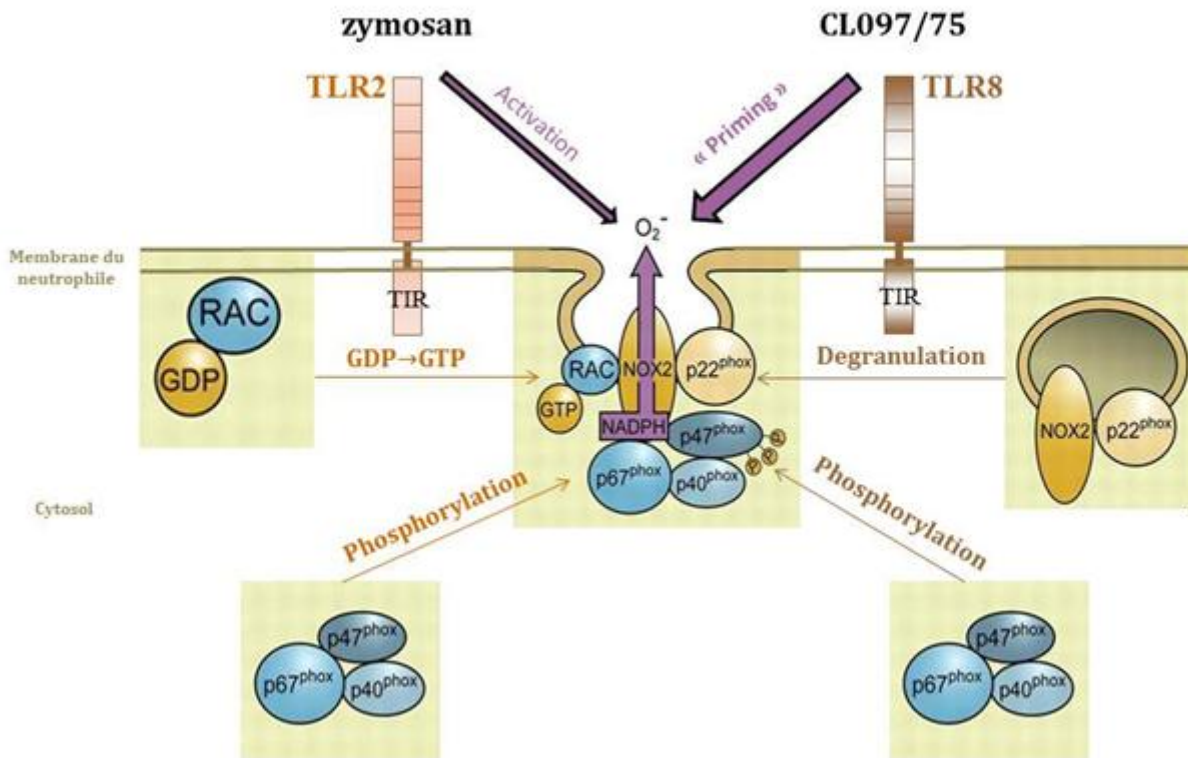
Nous avons signalé dans ce manuscrit que certains TLR, comme le TLR8, engagent des voies de signalisation qui n'induisent pas, seules, l'activation de la NADPH oxydase mais induisent un « priming » de cette activation permettant une activation plus rapide et plus intense de la NADPH oxydase en réponse à un deuxième stimulus comme le fMLF. D'autres TLR, comme

le TLR2, sont capables d'induire des voies de signalisation déclenchant par eux-mêmes l'activation de la NADPH oxydase. En effet, le zymosan est connu comme un ligand du récepteur dectine-1 et du TLR2 (Ozinsky et al., 2000). Des résultats de notre équipe ont montré que le zymosan opsonisé pourrait induire l'activation du composant cytosolique Rac2 et sa translocation vers la membrane des neutrophiles. En tenant compte de ces données et pour mieux comprendre les mécanismes induisant l'activation de la NADPH oxydase en réponse à cet agoniste, nous avons étudié l'effet du zymosan sur la phosphorylation de la p47phox et l'activation de Rac2. Les résultats obtenus montrent que le zymosan induit la phosphorylation de la p47phox sur différentes sérines : les sérines 345, 328 et 315. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de kinases a montré que ces phosphorylations sont induites par les MAPKines ERK1/2 et p38, une protéine tyrosine kinase et les PKC. Cette étude montre aussi que le zymosan active la petite protéine cytosolique Rac2, nécessaire à l'activation de la NADPH oxydase et dont l'activation est contrôlée par une tyrosine kinase (probablement Syk ou/et src kinase) et une PI3K. Ces résultats montrent que les voies de signalisation engagées par le zymosan via TLR2/Dectine-1 sont multiples, capables de phosphoryler les mêmes sites que TLR8 mais aussi d'activer Rac 2 qui est nécessaire à l'activation de la NADPH oxydase. L'engagement de ces 2 voies de signalisation expliquerait que le zymosan induise seul l'activation de l'oxydase. L'utilisation d'anticorps bloquant dirigés contre Dectine1 et TLR2 permettrait de montrer le rôle respectif de chacune de ces voies dans l'activation de la NADPH oxydase.

## 6- Conclusion

En conclusion mon travail de thèse a permis d'approfondir certains mécanismes par lesquels les TLR et leurs agonistes modulent la réponse des PN et particulier la production des FRO. L'activation du TLR8 induit une potentialisation de la réponse induite par le fMLF alors que l'activation du TLR2 induit une stimulation directe de la production des FRO par la NADPH oxydase phagocytaire (Figure 2). Le TLR 8 induit la phosphorylation de la p47phox et l'activation de la proline isomérase Pin1. Le TLR 2 induit la phosphorylation de la p47phox et l'activation de Rac2. Ces voies impliquées dans l'hyperactivation des PN par les ligands des TLR pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques dans les maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde dont on sait que le liquide synovial de

patients atteints par cette maladie contient de nombreux ligands endogènes et exogènes des TLR.



**Figure 2 : Effet des TLR2 et TLR8 sur la production des ROS par les neutrophiles humains**



## PERSPECTIVES

Dans ce travail nous avons montré que l'activation du TLR8 induit une augmentation de la production des FRO par les polynucléaires neutrophiles stimulés par le fMLF. Cet effet serait contrôlé par la phosphorylation de la p47phox et l'activation de la proline isomérase Pin1. Nous avons montré que les agonistes du TLR 8 (CL097 et CL075) induisent la phosphorylation de la p47phox au niveau de la serine 345, 328 et 315. La Ser345 serait phosphorylée par les MAPK ERK1/2 et p38, la serine 328 serait phosphorylée par les PKC, cependant la kinase qui phosphoryle la serine 315 n'est pas encore identifiée. D'autres inhibiteurs de kinases seront utilisés pour identifier la kinase impliquée dans la phosphorylation de ce site. La proline isomérase Pin1 est responsable du changement conformationnel de la p47phox pour faciliter la phosphorylation des autres sites et la translocation de la p47phox à la membrane (Boussetta et al., 2010). Nous étudierons le rôle de Pin1 dans la translocation des composants cytosoliques vers les membranes des neutrophiles et les voies impliquées dans l'activation de Pin1 dans les neutrophiles. Nous avons aussi montré que les agonistes du TLR8 induisent la translocation du cytochrome b558 à la membrane des neutrophiles. Cependant, les voies impliquées dans ce processus ne sont pas connues. Nous étudierons le rôle des kinases et de Pin1 dans la translocation du cytochrome b558 à la membrane plasmique.

L'ARN viral simple brin (ARNsb) est le ligand naturel de TLR7 et TLR8. Nos résultats suggèrent que le RNAsb pourrait induire le priming de la NADPH oxydase phagocytaire lors de l'infection virale via les TLR7/8. Récemment, Wang et al., ont montré que le virus de la grippe induit la production de cytokines par les neutrophiles via TLR7/8. D'autres études ont montré que les agonistes des TLR7/8 induisent une inflammation neuronale et une inflammation de la peau avec infiltration des neutrophiles chez la souris. Le priming de la NADPH oxydase induit par les agonistes des TLR7/8 et la production excessive de ROS pourraient participer à ces réactions inflammatoires. Ce serait donc important de tester l'effet des inhibiteurs qui inhibent le priming sur ces inflammation expérimentales.

Dans une autre étude nous avons montré que le zymosan induit l'activation de la NADPH oxydase des neutrophiles humains. Cependant, il a été montré que le zymosan est reconnu aussi par le TLR2 et par la Dectine1. La Dectine 1 est fortement exprimée dans les neutrophiles humains et son ligand spécifique peut induire la production des FRO dans les neutrophiles. L'implication de TLR2 et de la Dectine sera étudiée en utilisant des anticorps

bloquants de ces récepteurs. Le zymosan peut induire une inflammation sévère chez la souris. Les antagonistes des TLR2 et de la Dectine ainsi que les inhibiteurs des voies d'activation de la NADPH oxydase des neutrophiles pourrait inhiber cette inflammation.

## **REFERENCES**

## A

**Abo**, A., A. Boyhan, I. West, A. J. Thrasher and A. W. Segal (1992). "Reconstitution of neutrophil NADPH oxidase activity in the cell-free system by four components: p67-phox, p47-phox, p21rac1, and cytochrome b-245." *J Biol Chem* 267(24): 16767-16770.

**Agnese** DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis.* 2002 Nov 15;186(10):1522-5. Epub 2002 Oct 29.

**Ago**, T., H. Nunoi, T. Ito and H. Sumimoto (1999). "Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase." *J Biol Chem* 274(47): 33644-33653.

**Akira** S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Rev Immunol.* 2004; 4: 499-511.

**Akira** S. (2003) Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15, 5-11.

**Akira**, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511

**Akira**, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801

**Alexopoulou** L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001; 413:732-8

**Andersen-Nissen** E, Smith KD, Bonneau R, Strong RK, Aderem A. A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. *J Exp Med.* 2007; 204:393-403.

**Arai**, K. I., F. Lee, A. Miyajima, S. Miyatake, N. Arai and T. Yokota (1990). "Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses." *Annu Rev Biochem* 59: 783-836.

## B

**Babior**, B. M. (2000). "Phagocytes and oxidative stress." *Am J Med* 109(1): 33-44.

**Barbalat**, R., Lau, L., Locksley, R.M. & Barton, G.M. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat. Immunol.* 10, 1200–1207 (2009).

**Barrat** FJ, Coffman RL. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunol Rev.* 2008 Jun;223:271-83. Review.

- Bauldry**, S. A., R. L. Wykle and D. A. Bass (1991). "Differential actions of diacyl- and alkylacylglycerols in priming phospholipase A2, 5-lipoxygenase and acetyltransferase activation in human neutrophils." *Biochim Biophys Acta* 1084(2): 178-184.
- Bedard**, K. and K. H. Krause (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." *Physiol Rev* 87(1): 245-313.
- Bell** J. K., Mullen G. E., Leifer C. A., Mazzoni A., Davies D. R., Segal D. M. (2003) Leucine rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* 24, 528-533.
- Bengis-Garber**, C. and N. Gruener (1996). "Protein kinase A downregulates the phosphorylation of p47 phox in human neutrophils: a possible pathway for inhibition of the respiratory burst." *Cell Signal* 8(4): 291-296.
- Besse** A., Lamothe B., Campos A. D., Webster W. K., Maddineni U., Lin S. C., Wu H., Darnay B. G. (2007) TAK1-dependent signaling requires functional interaction with TAB2/TAB3. *J Biol Chem* 282, 3918-3928.
- Boissier** MC. Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis. *Joint Bone Spine* 2011;78:230–4).
- Borregaard**, N. (1996). "[Cellular biology of neutrophil granulocytes]." *Ugeskr Laeger* 158(27): 3908-3912.
- Borregaard**, N. and J. B. Cowland (1997). "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte." *Blood* 89(10): 3503-3521.
- Borregaard**, N., J. M. Heiple, E. R. Simons and R. A. Clark (1983). "Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation." *J Cell Biol* 97(1): 52-61.
- Bouin**, A. P., N. Grandvaux, P. V. Vignais and A. Fuchs (1998). "p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process." *J Biol Chem* 273(46): 30097-30103.
- Bourgoin**, S., E. Plante, M. Gaudry, P. H. Naccache, P. Borgeat and P. E. Poubelle (1990). "Involvement of a phospholipase D in the mechanism of action of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): priming of human neutrophils in vitro with GM-CSF is associated with accumulation of phosphatidic acid and diradylglycerol." *J Exp Med* 172(3): 767-777.
- Brown**, G. D., P. R. Taylor, D. M. Reid, J. A. Willment, D. L. Williams, L. Martinez-Pomares, S. Y. Wong, and S. Gordon. 2002. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* 196:407-412.

**Brown**, G.E., Stewart, M.Q., Liu, H., Ha, V.L., Yaffe, M.B. (2003) A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P(2), PtdIns(3)P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase. *Mol Cell* 11, 35-47.

**Burkhardt** H, Schwingel M, Menninger H, Macartney HW and Tschesche H. Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. Direct degradative effect on matrix components and indirect action via activation of latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes. *Arthritis Rheum.* 1986. 29(3):379-387.

**Butchi**, N. B., S. Pourciau, M. Du, T. W. Morgan, and K. E. Peterson. 2008. Analysis of the neuroinflammatory response to TLR7 stimulation in the brain: comparison of multiple TLR7 and/or TLR8 agonists. *J Immunol* 180:7604-7612.

## C

**Cadwallader**, K. A., A. M. Condliffe, A. McGregor, T. R. Walker, J. F. White, L. R. Stephens and E. R. Chilvers (2002). "Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation by neutrophil priming agents." *J Immunol* 169(6): 3336-3344.

**Cassatella**, M. A. (1995). "The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils." *Immunol Today* 16(1): 21-26.

**Castagna**, M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa and Y. Nishizuka (1982). "Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters." *J Biol Chem* 257(13): 7847-7851.

**Chen** K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Wang JM. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol.* 2007; 7:1271-85

**Chen** ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol.* 2005; 7:758-65.

**Chen**, H. I., A. Einbond, S. J. Kwak, H. Linn, E. Koepf, S. Peterson, J. W. Kelly and M. Sudol (1997). "Characterization of the WW domain of human yes-associated protein and its polyproline-containing ligands." *J Biol Chem* 272(27): 17070-17077.

**Chessa**, T. A., K. E. Anderson, Y. Hu, Q. Xu, O. Rausch, L. R. Stephens and P. T. Hawkins (2010). "Phosphorylation of threonine 154 in p40phox is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase." *Blood*.

**Cross**, A. R., P. G. Heyworth, J. Rae and J. T. Curnutte (1995). "A variant X-linked chronic granulomatous disease patient (X91+) with partially functional cytochrome b." *J Biol Chem* 270(14): 8194-8200.

**Cross**, A.R., Curnutte, J.T. (1995b) The cytosolic activating factors p47phox and p67phox have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *J Biol Chem* 270, 6543-8.

**Costa C. P., Kirschning C. J., Busch D., Durr S., Jennen L., Heinzmann U., Prebeck S., Wagner H., Miethke T. (2002)** Role of chlamydial heat shock protein 60 in the stimulation of innate immune cells by *Chlamydia pneumoniae*. *Eur J Immunol* 32, 2460- 2470.

**Curnutte, J. T., R. W. Erickson, J. Ding and J. A. Badwey (1994).** "Reciprocal interactions between protein kinase C and components of the NADPH oxidase complex may regulate superoxide production by neutrophils stimulated with a phorbol ester." *J Biol Chem* 269(14): 10813-10819.

## D

**Dang, P. M., A. Fontayne, J. Hakim, J. El Benna and A. Perianin (2001).** "Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst." *J Immunol* 166(2): 1206-1213.

**Dang, P. M., C. Dewas, M. Gaudry, M. Fay, E. Pedruzzi, M. A. Gougerot-Pocidalo and J. El Benna (1999).** "Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47(phox)." *J Biol Chem* 274(29): 20704-20708.

**Dang, P. M., C. Elbim, J. C. Marie, M. Chiandotto, M. A. Gougerot-Pocidalo and J. El-Benna (2006).** "Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity." *FASEB J* 20(9): 1504-1506.

**Dang, P. M., F. Morel, M. A. Gougerot-Pocidalo and J. El Benna (2003).** "Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region." *Biochemistry* 42(15): 4520-4526.

**Davis, A. R., P. L. Mascolo, P. L. Bunger, K. M. Sipes and M. T. Quinn (1998).** "Cloning and sequencing of the bovine flavocytochrome b subunit proteins, gp91-phox and p22-phox: comparison with other known flavocytochrome b sequences." *J Leukoc Biol* 64(1): 114-123.

**De Leo, F. R., K. V. Ulman, A. R. Davis, K. L. Jutila and M. T. Quinn (1996).** "Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67phox and flavocytochrome b to a common functional domain in p47phox." *J Biol Chem* 271(29): 17013-17020.

**Dekker, L. V. and P. J. Parker (1994).** "Protein kinase C--a question of specificity." *Trends Biochem Sci* 19(2): 73-77.

- DeLeo**, F. R., J. B. Burritt, L. Yu, A. J. Jesaitis, M. C. Dinuer and W. M. Nauseef (2000). "Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly." *J Biol Chem* 275(18): 13986-13993.
- DeLeo**, F. R., W. M. Nauseef, A. J. Jesaitis, J. B. Burritt, R. A. Clark and M. T. Quinn (1995). "A domain of p47phox that interacts with human neutrophil flavocytochrome b558." *J Biol Chem* 270(44): 26246-26251.
- DeLeo**, F.R., Allen, L.A., Apicella, M., Nauseef, W.M. (1999) NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J Immunol* 163, 6732-40.
- Dewas**, C., M. Fay, M. A. Gougerot-Pocidalo and J. El-Benna (2000). "The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils." *J Immunol* 165(9): 5238-5244.
- Dewas**, C., P. M. Dang, M. A. Gougerot-Pocidalo and J. El-Benna (2003). "TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *J Immunol* 171(8): 4392-4398.
- Didsbury**, J., R. F. Weber, G. M. Bokoch, T. Evans and R. Snyderman (1989). "rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates." *J Biol Chem* 264(28): 16378-16382.
- Diebold**, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and C. Reis e Sousa. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303:1529-1531.
- Dillon** S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, Maliszewski C, Akira S, Pulendran B. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol*. 2004; 172:4733-43.
- Dinuer**, M. C., S. H. Orkin, R. Brown, A. J. Jesaitis and C. A. Parkos (1987). "The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex." *Nature* 327(6124): 717-720.
- Dockrell** DH, Kinghorn GR. Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Dec; 48(6):751-5. Review.
- Dong**, L. Q., R. B. Zhang, P. Langlais, H. He, M. Clark, L. Zhu and F. Liu (1999). "Primary structure, tissue distribution, and expression of mouse phosphoinositide-dependent protein kinase-1, a protein kinase that phosphorylates and activates protein kinase C $\zeta$ ." *J Biol Chem* 274(12): 8117-8122.



**Dorseuil, O., L. Reibel, G. M. Bokoch, J. Camonis and G. Gacon (1996).** "The Rac target NADPH oxidase p67phox interacts preferentially with Rac2 rather than Rac1." *J Biol Chem* 271(1): 83-88.

**Doussiere, J., Bouzidi, F., Poinas, A., Gaillard, J., Vignais, P.V. (1999)** Kinetic study of the activation of the neutrophil NADPH oxidase by arachidonic acid. Antagonistic effects of arachidonic acid and phenylarsine oxide. *Biochemistry* 38, 16394-406.

**Doussiere, J., Gaillard, J., Vignais, P.V. (1996)** Electron transfer across the O<sub>2</sub>- generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component. *Biochemistry* 35, 13400-10.

**Downey, G. P., T. Fukushima, L. Fialkow and T. K. Waddell (1995).** "Intracellular signaling in neutrophil priming and activation." *Semin Cell Biol* 6(6): 345-356.

**Durand, D., C. Vives, D. Cannella, J. Perez, E. Pebay-Peyroula, P. Vachette and F. Fieschi (2010).** "NADPH oxidase activator p67(phox) behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers." *J Struct Biol* 169(1): 45-53.

**Dusi, S., Della Bianca, V., Grzeskowiak, M., Rossi, F. (1993)** Relationship between phosphorylation and translocation to the plasma membrane of p47phox and p67phox and activation of the NADPH oxidase in normal and Ca(2+)-depleted human neutrophils. *Biochem J* 290 ( Pt 1), 173-8.

**Dziarski, R., Platt, K. A., Gelius, E., Steiner, H. & Gupta, D.** Defect in neutrophil killing and increased susceptibility to infection with nonpathogenic Gram-positive bacteria in peptidoglycan recognition protein-S (PGRP-S)-deficient mice. *Blood* 102, 689–697 (2003).

## E

**Edwards, S.W. Hallett M.B.** Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis *Immunol Today*, 18 (1997), pp. 320–324

**Eggleton P, Wang L, Penhallow J, Crawford N and Brown KA.** Differences in oxidative response of subpopulations of neutrophils from healthy subjects and patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1995. 54(11):916-923.

**El Benna, J., J. Han, J. W. Park, E. Schmid, R. J. Ulevitch and B. M. Babior (1996).** "Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK." *Arch Biochem Biophys* 334(2): 395-400.

**El Benna, J., R. P. Faust, J. L. Johnson and B. M. Babior (1996).** "Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem* 271(11): 6374-6378.

**El-Benna J**, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol* 2008;3: 279–89

**El-Benna, J.**, P. M. Dang and A. Perianin (2010). "Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase." *Biochem Pharmacol* 80(6): 778-785.

**El-Benna, J.**, P. M. Dang and M. A. Gougerot-Pocidalo (2008). "Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane." *Semin Immunopathol* 30(3): 279-289.

**El-Benna, J.**, P. M. Dang, M. A. Gougerot-Pocidalo, J. C. Marie and F. Braut-Boucher (2009). "p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases." *Exp Mol Med* 41(4): 217-225.

**Elbim, C.**, S. Bailly, S. Chollet-Martin, J. Hakim and M. A. Gougerot-Pocidalo (1994). "Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides." *Infect Immun* 62(6): 2195-2201.

**Ellson, C. D.**, S. Gobert-Gosse, K. E. Anderson, K. Davidson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. W. Thuring, M. A. Cooper, Z. Y. Lim, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, J. Coadwell, E. R. Chilvers, P. T. Hawkins and L. R. Stephens (2001). "PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox)." *Nat Cell Biol* 3(7): 679-682.

**Erickson, R.W.**, Langel-Peveri, P., Traynor-Kaplan, A.E., Heyworth, P.G., Curnutte, J.T. (1999) Activation of human neutrophil NADPH oxidase by phosphatidic acid or diacylglycerol in a cell-free system. Activity of diacylglycerol is dependent on its conversion to phosphatidic acid. *J Biol Chem* 274, 22243-50.

**Ermolaeva, M.A.** et al. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 9, 1037–1046 (2008).

**Erwig, L. P.** and P. M. Henson (2007). "Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis." *Am J Pathol* 171(1): 2-8.

## **F**

**Faust, L. R.**, J. el Benna, B. M. Babior and S. J. Chanock (1995). "The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis." *J Clin Invest* 96(3): 1499-1505.

**Ferguson, S. S.** (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." *Pharmacol Rev* 53(1): 1-24.

**Flannagan, R. S.**, Cosio, G., and Grinstein, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* 7(5), 355-66.).

**Fontayne, A., P. M. Dang, M. A. Gougerot-Pocidalo and J. El-Benna (2002).** "Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation." *Biochemistry* 41(24): 7743-7750.

**Forbes, L.V., Moss, S.J., Segal, A.W. (1999)** Phosphorylation of p67phox in the neutrophil occurs in the cytosol and is independent of p47phox. *FEBS Lett* 449, 225-9.

**Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ.** Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*. 1980 Jul 17; 286(5770):264-5.

**Francke, U., C. L. Hsieh, B. E. Foellmer, K. J. Lomax, H. L. Malech and T. L. Leto (1990).** "Genes for two autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease assigned to 1q25 (NCF2) and 7q11.23 (NCF1)." *Am J Hum Genet* 47(3): 483-492.

**Fuchs, A., A. P. Bouin, T. Rabilloud and P. V. Vignais (1997).** "The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells." *Eur J Biochem* 249(2): 531-539.

**Fuchs, A., A. P. Bouin, T. Rabilloud and P. V. Vignais (1997).** "The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells." *Eur J Biochem* 249(2): 531-539.

**Fuchs, T. A. et al.** Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176, 231–241 (2007).

## G

**Galat, A. (2000).** "Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes." *Eur J Biochem* 267(16): 4945-4959.

**Galat, A. and S. M. Metcalfe (1995).** "Peptidylproline cis/trans isomerases." *Prog Biophys Mol Biol* 63(1): 67-118.

**Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, and D. M. Underhill. 2003.** Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 197:1107-1117.

**Ganz, T. and R. I. Lehrer (1995).** "Defensins." *Pharmacol Ther* 66(2): 191-205.

**Gay, N. J., and Gangloff, M. (2007).** Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* 76, 141-65.

**Geisse J. K., Rich P., Pandya A., Gross K., Andres K., Ginkel A., Owens M. (2002)** Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: a doubleblind, randomized, vehicle-controlled study. *J Am Acad Dermatol* 47, 390-398.

**Geiszt, M., J. Witta, J. Baffi, K. Lekstrom and T. L. Leto (2003).** "Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense." *FASEB J* 17(11): 1502-1504.

**Geiszt, M., M. C. Dagher, G. Molnar, A. Havasi, J. Faure, M. H. Paclet, F. Morel and E. Ligeti (2001).** "Characterization of membrane-localized and cytosolic Rac-GTPase-activating proteins in human neutrophil granulocytes: contribution to the regulation of NADPH oxidase." *Biochem J* 355(Pt 3): 851-858.

**Gilroy, D. W., T. Lawrence, M. Perretti and A. G. Rossi (2004).** "Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* 3(5): 401-416.

**Ginsel, L. A., J. J. Onderwater, J. A. Fransen, A. J. Verhoeven and D. Roos (1990).** "Localization of the low-Mr subunit of cytochrome b558 in human blood phagocytes by immunoelectron microscopy." *Blood* 76(10): 2105-2116.

**Ginsel, L.A., Onderwater, J.J., Fransen, J.A., Verhoeven, A.J., Roos, D. (1990)** Localization of the low-Mr subunit of cytochrome b558 in human blood phagocytes by immunoelectron microscopy. *Blood* 76, 2105-16.

**Gomi K., Kawasaki K., Kawai Y., Shiozaki M., Nishijima M. (2002)** Toll-like receptor 4-MD-2 complex mediates the signal transduction induced by flavolipin, an amino acid-containing lipid unique to *Flavobacterium meningosepticum*. *J Immunol* 168, 2939- 2943.

**Gosselin J, Borgeat P, Flamand L.** Leukotriene B4 protects latently infected mice against murine cytomegalovirus reactivation following allogeneic transplantation. *J Immunol.* 2005 Feb 1;174(3):1587-93.

**Gothel, S. F. and M. A. Marahiel (1999).** "Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts." *Cell Mol Life Sci* 55(3): 423-436.

**Gougerot-Pocidalo, M.A.** Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines. *J Soc Biol*, 2002. 196(1): p. 37-46.

**Groemping, Y. and K. Rittinger (2005).** "Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective." *Biochem J* 386(Pt 3): 401-416.

**Groemping, Y., K. Lapouge, S. J. Smerdon and K. Rittinger (2003).** "Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase." *Cell* 113(3): 343-355.

## H

**Haataja, L., J. Groffen and N. Heisterkamp (1997).** "Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family." *J Biol Chem* 272(33): 20384-20388.

**Hacker, H. & Karin, M.** Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci. STKE* 357, re13 (2006).

**Hampton**, M. B., A. J. Kettle and C. C. Winterbourn (1998). "Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing." *Blood* 92(9): 3007-3017.

**Harper**, A.M., Chaplin, M.F., Segal, A.W. (1985) Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. *Biochem J* 227, 783-8.

**Hasan** U., Chaffois C., Gaillard C., Saulnier V., Merck E., Tancredi S., Guet C., Briere F., Vlach J., Lebecque S., Trinchieri G., Bates E. E. (2005) Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 174, 2942-2950.

**Hayashi** F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2660-9. Epub 2003 Jun 26.

**Hayashi** F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akira S., Underhill D. M., Aderem A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103.

**Heil** F., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Kirschning C., Akira S., Lipford G., Wagner H., Bauer S. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529.

**Hemmi** H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*. 2002; 3:196-200.

**Hertzog** PJ, O'Neill LA, Hamilton JA. The interferon in TLR signaling: more than just antiviral. *Trends Immunol*. 2003 Oct;24(10):534-9. Review.

**Heyworth**, P. G., B. P. Bohl, G. M. Bokoch and J. T. Curnutte (1994). "Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558." *J Biol Chem* 269(49): 30749-30752.

**Heyworth**, P. G., U. G. Knaus, J. Settleman, J. T. Curnutte and G. M. Bokoch (1993). "Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s)." *Mol Biol Cell* 4(11): 1217-1223.

**Hitchon** CA and El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2004. 6(6):265-278.

**Hoffmann** J. A. (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33-38.

**Hopkins** P. A., Sriskandan S. (2005) Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* 140, 395-407.

**Hornung** V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human

peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol.* 2002 May 1;168(9):4531-7.

**Hoyal**, C.R., Gutierrez, A., Young, B.M., Catz, S.D., Lin, J.H., Tsichlis, P.N., Babior, B.M. (2003) Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt dependent activation of the NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5130-5.

**Huang**, J. and M. E. Kleinberg (1999). "Activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Phosphorylation controls SH3 domain-dependent binding to p22(phox)." *J Biol Chem* 274(28): 19731-19737.

**Hwang**, T. L., H. W. Hung, S. H. Kao, C. M. Teng, C. C. Wu and S. J. Cheng (2003). "Soluble guanylyl cyclase activator YC-1 inhibits human neutrophil functions through a cGMP-independent but cAMP-dependent pathway." *Mol Pharmacol* 64(6): 1419-1427.

## I

**Imler** J. L., Hoffmann J. A. (2001) Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol* 11, 304-311.

**Ishitoya**, J., Yamakawa, A., Takenawa, T. (1987) Translocation of diacylglycerol kinase in response to chemotactic peptide and phorbol ester in neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 144, 1025-30.

**Iwasaki** A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004; 5:987-95.

## J

**Jaillon**, S. et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J. Exp. Med.* 204, 793–804 (2007)

**Janeway** C. A., Jr., Medzhitov R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.

**Jin**, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., Lee, H., and Lee, J. O. (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. *Cell* 130(6), 1071-82.

**Jin**, M.S, et al. Crystal structure of the TLR1–TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. *Cell* 130, 1071–1082 (2007).

**Johnson**, J. L., J. W. Park, J. E. Benna, L. P. Faust, O. Inanami and B. M. Babior (1998). "Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity." *J Biol Chem* 273(52): 35147-35152.

**Jurk I.** Ophthalmic disease of fish. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2002 May;5(2):243-60, v. Review.

## K

**Kadowaki N,** Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001 Sep 17;194(6):863-9. PubMed PMID: 11561001;

**Kaisho T.,** Akira S. (2004) Pleiotropic function of Toll-like receptors. *Microbes Infect* 6, 1388-1394.

**Kakimoto K,** Kojima Y, Ishii K, Onoue K and Maeda H. The suppressive effect of gelatinconjugated superoxide dismutase on disease development and severity of collagen-induced arthritis in mice. *Clin Exp Immunol.* 1993. 94(2):241-246.

**Kang, J.Y.** et al. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 31, 873–884 (2009).

**Karikó K,** Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem.* 2004; 279:12542-50.

**Karlsson, A.,** J. B. Nixon and L. C. McPhail (2000). "Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase." *J Leukoc Biol* 67(3): 396-404.

**Kawagoe, T.** et al. Sequential control of Toll-like receptor–dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat. Immunol.* 9, 684–691 (2008).

**Kawai T,** Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 2006; 13:816-25.

**Kennedy, A. D.** and F. R. DeLeo (2009). "Neutrophil apoptosis and the resolution of infection." *Immunol Res* 43(1-3): 25-61.

**Kent, J. D.,** S. Sergeant, D. J. Burns and L. C. McPhail (1996). "Identification and regulation of protein kinase C-delta in human neutrophils." *J Immunol* 157(10): 4641-4647.

**Khwaja, A.,** J. E. Carver and D. C. Linch (1992). "Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte CSF, and tumor necrosis factor alpha in the priming of the neutrophil respiratory burst." *Blood* 79(3): 745-753.

**Klinman D. M.,** Currie D., Gursel I., Verthelyi D. (2004) Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* 199, 201-216.

**Knaus, U. G.,** P. G. Heyworth, T. Evans, J. T. Curnutte and G. M. Bokoch (1991). "Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2." *Science* 254(5037): 1512-1515.

**Kodama**, T., K. Hazeki, O. Hazeki, T. Okada and M. Ui (1999). "Enhancement of chemotactic peptide-induced activation of phosphoinositide 3-kinase by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its relation to the cytokine-mediated priming of neutrophil superoxide-anion production." *Biochem J* 337 ( Pt 2): 201-209.

**Koga**, H., H. Terasawa, H. Nunoi, K. Takeshige, F. Inagaki and H. Sumimoto (1999). "Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase." *J Biol Chem* 274(35): 25051-25060.

**Kramer**, I. M., R. L. van der Bend, A. J. Verhoeven and D. Roos (1988). "The 47-kDa protein involved in the NADPH:O<sub>2</sub> oxidoreductase activity of human neutrophils is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase without induction of a respiratory burst." *Biochim Biophys Acta* 971(2): 189-196.

**Krumbholz**, K. Schönermarck, M., et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009;15:623–5

**Krump**, E., J. S. Sanghera, S. L. Pelech, W. Furuya and S. Grinstein (1997). "Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils." *J Biol Chem* 272(2): 937-944.

**Kurt-Jones** E. A., Popova L., Kwinn L., Haynes L. M., Jones L. P., Tripp R. A., Walsh E. E., Freeman M. W., Golenbock D. T., Anderson L. J., Finberg R. W. (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus.

*Nat Immunol* 1, 398-401.

**Kurt-Jones**, E. A., L. Mandell, C. Whitney, A. Padgett, K. Gosselin, P. E. Newburger, and R. W. Finberg. 2002. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* 100:1860-1868.

**Kwong**, C. H., H. L. Malech, D. Rotrosen and T. L. Leto (1993). "Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by rho-related G-proteins." *Biochemistry* 32(21): 5711-5717.

**Kyriakis** J. M., Avruch J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81, 807-869.

## **L**

**Lapouge**, K., S. J. Smith, Y. Groemping and K. Rittinger (2002). "Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox." *J Biol Chem* 277(12): 10121-10128.

**Lau** CM, Broughton C, Tabor AS, Akira S, Flavell RA, Mamula MJ, Christensen SR, Shlomchik MJ, Viglianti GA, Rifkin IR, Marshak-Rothstein A. RNA-associated autoantigens



activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med*. 2005; 202:1171-7.

**Lawlor**, M. A. and D. R. Alessi (2001). "PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?" *J Cell Sci* 114(Pt 16): 2903-2910.

**Lehrer**, R. I., A. K. Lichtenstein and T. Ganz (1993). "Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells." *Annu Rev Immunol* 11: 105-128.

**Lemaitre** B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996; 86:973-83.

**Leto**, T. L., A. G. Adams and I. de Mendez (1994). "Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22): 10650-10654.

**Leusen**, J.H., de Boer, M., Bolscher, B.G., Hilarius, P.M., Weening, R.S., Ochs, H.D., Roos, D., Verhoeven, A.J. (1994) A point mutation in gp91-phox of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase leading to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. *J Clin Invest* 93, 2120-6.

**Leusen**, J.H., Meischl, C., Eppink, M.H., Hilarius, P.M., de Boer, M., Weening, R.S., Ahlin, A., Sanders, L., Goldblatt, D., Skopczynska, H., Bernatowska, E., Palmblad, J., Verhoeven, A.J., van Berkel, W.J., Roos, D. (2000) Four novel mutations in the gene encoding gp91-phox of human NADPH oxidase: consequences for oxidase assembly. *Blood* 95, 666-73.

**Levy**, O. (1996). "Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes." *Eur J Haematol* 56(5): 263-277.

**Li** S., Strelow A., Fontana E. J., Wesche H. (2002) IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5567-5572.

**Li**, J., Guillory, R.J. (1997) Purified leukocyte cytochrome b558 incorporated into liposomes catalyzes a cytosolic factor dependent diaphorase activity. *Biochemistry* 36, 5529-37.

**Li**, X.J., Fieschi, F., Paclet, M.H., Grunwald, D., Campion, Y., Gaudin, P., Morel, F., Stasia, M.J. (2007) Leu505 of Nox2 is crucial for optimal p67phox-dependent activation of the flavocytochrome b558 during phagocytic NADPH oxidase assembly. *J Leukoc Biol* 81, 238-49.

**Li**, X.J., Grunwald, D., Mathieu, J., Morel, F., Stasia, M.J. (2005) Crucial role of two potential cytosolic regions of Nox2, 191TSSTKTIRRS200 and 484DESQANHFAVHHDEEKD500, on NADPH oxidase activation. *J Biol Chem* 280, 14962-73.

**Liota E.**, Smith K. J., Buckley R., Menon P., Skelton H. (2000) Imiquimod therapy for molluscum contagiosum. *J Cutan Med Surg* 4, 76-82.

**Liu, W.**, H. D. Youn, X. Z. Zhou, K. P. Lu and J. O. Liu (2001). "Binding and regulation of the transcription factor NFAT by the peptidyl prolyl cis-trans isomerase Pin1." *FEBS Lett* 496(2-3): 105-108.

**Lu, K. P.** (2000). "Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel cell cycle regulatory mechanism." *Prog Cell Cycle Res* 4: 83-96.

**Lu, K. P.**, S. D. Hanes and T. Hunter (1996). "A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis." *Nature* 380(6574): 544-547.

**Lu, P. J.**, X. Z. Zhou, M. Shen and K. P. Lu (1999). "Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules." *Science* 283(5406): 1325-1328.

**Lu, P. J.**, X. Z. Zhou, Y. C. Liou, J. P. Noel and K. P. Lu (2002). "Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function." *J Biol*

**Lund J. M.**, Alexopoulou L., Sato A., Karow M., Adams N. C., Gale N. W., Iwasaki A., Flavell R. A. (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5598-5603.

**Lund J.**, Sato A., Akira S., Medzhitov R., Iwasaki A. (2003) Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 198, 513-520.

**Luo C.**, Zheng L. (2000) Independent evolution of Toll and related genes in insects and mammals. *Immunogenetics* 51, 92-98.

**Luo, H. R.** and F. Loison (2008). "Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation." *Am J Hematol* 83(4): 288-295.

## M

**Maly, F.E.**, Schuerer-Maly, C.C., Quilliam, L., Cochrane, C.G., Newburger, P.E., Curnutte, J.T., Gifford, M., Dinanuer, M.C. (1993) Restitution of superoxide generation in autosomal cytochromenegative chronic granulomatous disease (A22(0) CGD)-derived B lymphocyte cell lines by transfection with p22phax cDNA. *J Exp Med* 178, 2047-53.

**Malyak, M.**, M. F. Smith, Jr., A. A. Abel and W. P. Arend (1994). "Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta." *J Clin Immunol* 14(1): 20-30.

- Malyak**, M., M. F. Smith, Jr., A. A. Abel, K. R. Hance and W. P. Arend (1998). "The differential production of three forms of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils and monocytes." *J Immunol* 161(4): 2004-2010.
- Marcoux**, J., P. Man, I. Petit-Haertlein, C. Vives, E. Forest and F. Fieschi (2010). "p47phox molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex." *J Biol Chem* 285(37): 28980-28990.
- Marcoux**, J., P. Man, M. Castellan, C. Vives, E. Forest and F. Fieschi (2009). "Conformational changes in p47(phox) upon activation highlighted by mass spectrometry coupled to hydrogen/deuterium exchange and limited proteolysis." *FEBS Lett* 583(4): 835-840.
- Martyn**, K.D., Frederick, L.M., von Loehneysen, K., Dinauer, M.C., Knaus, U.G. (2006) Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 18, 69-82.
- Martyn**, K.D., Kim, M.J., Quinn, M.T., Dinauer, M.C., Knaus, U.G. (2005) p21-activated kinase (Pak) regulates NADPH oxidase activation in human neutrophils. *Blood* 106, 3962-9.
- Massari** P., Henneke P., Ho Y., Latz E., Golenbock D. T., Wetzler L. M. (2002) Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol* 168, 1533-1537.
- Massenet**, C., S. Chénavas, C. Cohen-Addad, M. C. Dagher, G. Brandolin, E. Pebay-Peyroula and F. Fieschi (2005). "Effects of p47phox C terminus phosphorylations on binding interactions with p40phox and p67phox. Structural and functional comparison of p40phox and p67phox SH3 domains." *J Biol Chem* 280(14): 13752-13761.
- Matsumoto** M, Funami K, Oshiumi H, Seya T. Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiol Immunol*. 2004;48(3):147-54.
- Matsumoto** M., Kikkawa S., Kohase M., Miyake K., Seya T. (2002) Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1364-1369.
- Matzinger** P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*. 1994; 12:991-1045.
- McColl**, S. R., D. Beauseigle, C. Gilbert and P. H. Naccache (1990). "Priming of the human neutrophil respiratory burst by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor- $\alpha$  involves regulation at a post-cell surface receptor level. Enhancement of the effect of agents which directly activate G proteins." *J Immunol* 145(9): 3047-3053.
- McLeish**, K. R., C. Knall, R. A. Ward, P. Gerwins, P. Y. Coxon, J. B. Klein and G. L. Johnson (1998). "Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF- $\alpha$  and GM-CSF." *J Leukoc Biol* 64(4): 537-545.

**Means** T. K., Wang S., Lien E., Yoshimura A., Golenbock D. T., Fenton M. J. (1999) Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 163, 3920-3927.

**Medzhitov** R., Preston-Hurlburt P., Janeway C. A., Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.

**Medzhitov** R., Preston-Hurlburt P., Kopp E., Stadlen A., Chen C., Ghosh S., Janeway C. A., Jr. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2, 253-258.

**Medzhitov**, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1(2), 135-45.

**Melchjorsen** J., Jensen S. B., Malmgaard L., Rasmussen S. B., Weber F., Bowie A. G., Matikainen S., Paludan S. R. (2005) Activation of Innate Defense against a Paramyxovirus Is Mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a Cell-Type-Specific Manner. *J Virol* 79, 12944-12951.

**Mellor**, H. and P. J. Parker (1998). "The extended protein kinase C superfamily." *Biochem J* 332 ( Pt 2): 281-292.

**Miller** RL, Meng TC, Tomai MA. The antiviral activity of Toll-like receptor 7 and 7/8 agonists. *Drug News Perspect.* 2008; 21: 69–87

**Mizuki**, K., R. Takeya, F. Kuribayashi, I. Nobuhisa, D. Kohda, H. Nunoi, K. Takeshige and H. Sumimoto (2005). "A region C-terminal to the proline-rich core of p47phox regulates activation of the phagocyte NADPH oxidase by interacting with the C-terminal SH3 domain of p67phox." *Arch Biochem Biophys* 444(2): 185-194.

**Mizuki**, K., R. Takeya, F. Kuribayashi, I. Nobuhisa, D. Kohda, H. Nunoi, K. Takeshige and H. Sumimoto (2005). "A region C-terminal to the proline-rich core of p47phox regulates activation of the phagocyte NADPH oxidase by interacting with the C-terminal SH3 domain of p67phox." *Arch Biochem Biophys* 444(2): 185-194.

**Moll**, J., G. Sansig, E. Fattori and H. van der Putten (1991). "The murine rac1 gene: cDNA cloning, tissue distribution and regulated expression of rac1 mRNA by disassembly of actin microfilaments." *Oncogene* 6(5): 863-866.

**Morel**, F. (2007). "[Molecular aspects of chronic granulomatous disease. "the NADPH oxidase complex"]." *Bull Acad Natl Med* 191(2): 377-390; discussion 390-372.

**Morel**, F., J. Doussiere, M. J. Stasia and P. V. Vignais (1985). "The respiratory burst of bovine neutrophils. Role of a b type cytochrome and coenzyme specificity." *Eur J Biochem* 152(3): 669-679.

**Muzio** M., Polentarutti N., Bosisio D., Manoj Kumar P. P., Mantovani A. (2000) Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans* 28, 563-566.

**Mytar** B, Wołoszyn M, Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, Ruggiero I, Wieckiewicz J, Zembala M. Tumor cell-induced deactivation of human monocytes. *J Leukoc Biol*. 2003 Dec;74(6):1094-101. Epub 2003 Aug 21.

## N

**Naccache**, P. H., S. Levasseur, G. Lachance, S. Chakravarti, S. G. Bourgoïn and S. R. McColl (2000). "Stimulation of human neutrophils by chemotactic factors is associated with the activation of phosphatidylinositol 3-kinase gamma." *J Biol Chem* 275(31): 23636-23641.

**Nathan**, C. (2006). "Neutrophils and immunity: challenges and opportunities." *Nat Rev Immunol* 6(3): 173-182.

**Nauseef**, W. M., B. D. Volpp, S. McCormick, K. G. Leidal and R. A. Clark (1991). "Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components." *J Biol Chem* 266(9): 5911-5917.

**Netea**, M. G., C. Van der Graaf, J. W. Van der Meer, and B. J. Kullberg. 2004. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23:672-676.

**Neufert**, C., R. K. Pai, E. H. Noss, M. Berger, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2001. Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. *J Immunol* 167:1542-1549.

**Nishiya** T., Kajita E., Miwa S., Defranco A. L. (2005) TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J Biol Chem* 280, 37107-37117.

**Nishizuka**, Y. (1986). "Studies and perspectives of protein kinase C." *Science* 233(4761): 305-312.

**Nishizuka**, Y. (1995). "Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses." *FASEB J* 9(7): 484-496.

**Nisimoto**, Y., S. Motalebi, C. H. Han and J. D. Lambeth (1999). "The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558)." *J Biol Chem* 274(33): 22999-23005.

**Nixon**, J. B. and L. C. McPhail (1999). "Protein kinase C (PKC) isoforms translocate to Triton-insoluble fractions in stimulated human neutrophils: correlation of conventional PKC with activation of NADPH oxidase." *J Immunol* 163(8): 4574-4582.

**Nunoi**, H., D. Rotrosen, J. I. Gallin and H. L. Malech (1988). "Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors." *Science* 242(4883): 1298-1301.

## O

**Ogus** AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, Coskun M, Cilli A, Yegin O. The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J*. 2004 Feb; 23(2):219-23

**O'Neill** LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7:353-64.

## P

**Paclet**, M. H., S. Berthier, L. Kuhn, J. Garin and F. Morel (2007). "Regulation of phagocyte NADPH oxidase activity: identification of two cytochrome b558 activation states." *FASEB J* 21(4): 1244-1255.

**Palmblad** J, Malmsten CL, Udén AM, Rådmark O, Engstedt L, Samuelsson B. Leukotriene B4 is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood*. 1981 Sep; 58(3):658-61.

**Park**, J. W. and B. M. Babior (1997). "Activation of the leukocyte NADPH oxidase subunit p47phox by protein kinase C. A phosphorylation-dependent change in the conformation of the C-terminal end of p47phox." *Biochemistry* 36(24): 7474-7480.

**Park**, J. W., M. Ma, J. M. Ruedi, R. M. Smith and B. M. Babior (1992). "The cytosolic components of the respiratory burst oxidase exist as a M(r) approximately 240,000 complex that acquires a membrane-binding site during activation of the oxidase in a cell-free system." *J Biol Chem* 267(24): 17327-17332.

**Patra**, D., S. X. Wang, A. Kumagai and W. G. Dunphy (1999). "The xenopus Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators." *J Biol Chem* 274(52): 36839-36842.

**Picard** C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K, Soudais C, Dupuis S, Feinberg J, Fieschi C, Elbim C, Hitchcock R, Lammas D, Davies G, Al-Ghonaïm A, Al-Rayes H, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Al-Mohsen IZ, Frayha HH, Rucker R, Hawn TR, Aderem A, Tufenkeji H, Haraguchi S, Day NK, Good RA, Gougerot-Pocidalo MA, Ozinsky A, Casanova JL. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science*. 2003 Mar 28;299(5615):2076-9. Epub 2003 Mar 13.

**Pobezinskaya, Y.L.** et al. The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 9, 1047– 1054 (2008).

## Q

**Quinn, M. T.,** T. Evans, L. R. Loetterle, A. J. Jesaitis and G. M. Bokoch (1993). "Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components." *J Biol Chem* 268(28): 20983-20987.

**Quinn, M.T.,** Mullen, M.L., Jesaitis, A.J. (1992a) Human neutrophil cytochrome b contains multiple hemes. Evidence for heme associated with both subunits. *J Biol Chem* 267, 7303-9.

**Quinn, M.T.,** Mullen, M.L., Jesaitis, A.J., Linner, J.G. (1992b) Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b559. *Blood* 79, 1563-73.

## R

**Raad, H.,** M. H. Paclet, T. Boussetta, Y. Kroviarski, F. Morel, M. T. Quinn, M. A. Gougerot-Pocidallo, P. M. Dang and J. El-Benna (2009). "Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox." *FASEB J* 23(4): 1011-1022.

**Rahfeld, J. U.,** A. Schierhorn, K. Mann and G. Fischer (1994). "A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from Escherichia coli." *FEBS Lett* 343(1): 65-69.

**Rassa J. C.,** Meyers J. L., Zhang Y., Kudravalli R., Ross S. R. (2002) Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2281-2286.

**Rahfeld, J. U.,** K. P. Rucknagel, G. Stoller, S. M. Horne, A. Schierhorn, K. D. Young and G. Fischer (1996). "Isolation and amino acid sequence of a new 22-kDa FKBP-like peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase of Escherichia coli. Similarity to Mip-like proteins of pathogenic bacteria." *J Biol Chem* 271(36): 22130-22138.

**Ravichandran, K. S.** and U. Lorenz (2007). "Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal." *Nat Rev Immunol* 7(12): 964-974.

**Reeves, E. P.,** L. V. Dekker, L. V. Forbes, F. B. Wientjes, A. Grogan, D. J. Pappin and A. W. Segal (1999). "Direct interaction between p47phox and protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils." *Biochem J* 344 Pt 3: 859-866.

**Regier, D. S.,** D. G. Greene, S. Sergeant, A. J. Jesaitis and L. C. McPhail (2000). "Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent

mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation." *J Biol Chem* 275(37): 28406-28412.

**Regier**, D. S., K. A. Waite, R. Wallin and L. C. McPhail (1999). "A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22(phox), an NADPH oxidase component." *J Biol Chem* 274(51): 36601-36608.

**Roos**, D. (1994). "The genetic basis of chronic granulomatous disease." *Immunol Rev* 138: 121-157.

**Roos**, D., M. de Boer, F. Kuribayashi, C. Meischl, R. S. Weening, A. W. Segal, A. Ahlin, K. Nemet, J. P. Hossle, E. Bernatowska-Matuszkiewicz and H. Middleton-Price (1996). "Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease." *Blood* 87(5): 1663-1681.

**Roos**, D., R. van Bruggen and C. Meischl (2003). "Oxidative killing of microbes by neutrophils." *Microbes Infect* 5(14): 1307-1315.

**Rotrosen**, D. and T. L. Leto (1990). "Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. Translocation to membrane is associated with distinct phosphorylation events." *J Biol Chem* 265(32): 19910-19915.

**Rotrosen**, D., C. L. Yeung, T. L. Leto, H. L. Malech and C. H. Kwong (1992). "Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase." *Science* 256(5062): 1459-1462.

**Royer-Pokora**, B., Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Goff, S.C., Newburger, P.E., Baehner, R.L., Cole, F.S., Curnutte, J.T., Orkin, S.H. (1986) Cloning the gene for an inherited human disorder—chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* 322, 32-8.

## S

**Sabroe**, I., S. K. Dower, and M. K. Whyte. 2005. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7:S421-426.

**Salasche** S. (2002) Imiquimod 5% cream: a new treatment option for basal cell carcinoma. *Int J Dermatol* 41 Suppl 1, 16-20.

**Salomão** R, Martins PS, Brunialti MK, Fernandes Mda L, Martos LS, Mendes ME, Gomes NE, Rigato O. TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock*. 2008 Oct;30 Suppl 1:73-7. Review.

**Sasaki**, T., J. Irie-Sasaki, R. G. Jones, A. J. Oliveira-dos-Santos, W. L. Stanford, B. Bolon, A. Wakeham, A. Itie, D. Bouchard, I. Kozieradzki, N. Joza, T. W. Mak, P. S. Ohashi, A. Suzuki



and J. M. Penninger (2000). "Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration." *Science* 287(5455): 1040-1046.

**Scheid**, M. P. and J. R. Woodgett (2003). "Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt." *FEBS Lett* 546(1): 108-112.

**Schlaepfer** E, Audigé A, Joller H, Speck RF. TLR7/8 triggering exerts opposing effects in acute versus latent HIV infection. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):2888-95.

**Segal**, A. W. (1987). "Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease." *Nature* 326(6108): 88-91.

**Segal**, A. W. (1987). "Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease." *Nature* 326(6108): 88-91.

**Segal**, A.W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 197-223

**Segal**, A.W., West, I., Wientjes, F., Nugent, J.H., Chavan, A.J., Haley, B., Garcia, R.C., Rosen, H., Scrace, G. (1992) Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J* 284 ( Pt 3), 781-8.

**Serhan**, C. N. (2010). "Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not?" *Am J Pathol* 177(4): 1576-1591.

**Shabani** F, McNeil J and Tippett L. The oxidative inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) by hypochlorous acid (HOCl) is suppressed by anti-rheumatic drugs. *Free Radic Res.* 1998. 28(2):115-23.

**Shibuya** H., Yamaguchi K., Shirakabe K., Tonegawa A., Gotoh Y., Ueno N., Irie K., Nishida E., Matsumoto K. (1996) TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGFbeta signal transduction. *Science* 272, 1179-1182.

**Shiose**, A. and H. Sumimoto (2000). "Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase." *J Biol Chem* 275(18): 13793-13801.

**Slack** J. L., Schooley K., Bonnert T. P., Mitcham J. L., Qwarnstrom E. E., Sims J. E., Dower S. K. (2000) Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* 275, 4670-4678.

**Smith**, C. W. (1993). "Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation." *Can J Physiol Pharmacol* 71(1): 76-87.

**Smith**, G. P. and T. J. Peters (1982). "The release of granule components from human polymorphonuclear leukocytes in response to both phagocytic and chemical stimuli." *Biochim Biophys Acta* 719(2): 304-308.

**Smith, J. A.** (1994). "Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword." *J Leukoc Biol* 56(6): 672-686.

**Smits, E. L., P. Ponsaerts, Z. N. Berneman, and V. F. Van Tendeloo.** 2008. The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *Oncologist* 13:859-875.

**Stein D, Roth S, Vogelsang E, Nüsslein-Volhard C.** The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell*. 1991; 65:725-35.

**Stephens, L., A. Smrcka, F. T. Cooke, T. R. Jackson, P. C. Sternweis and P. T. Hawkins** (1994). "A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits." *Cell* 77(1): 83-93.

**Stockfleth E., Meyer T., Benninghoff B., Salasche S., Papadopoulos L., Ulrich C., Christophers E.** (2002) A randomized, double-blind, vehicle-controlled study to assess 5% imiquimod cream for the treatment of multiple actinic keratoses. *Arch Dermatol* 138, 1498-1502.

**Sumimoto, H., Sakamoto, N., Nozaki, M., Sakaki, Y., Takeshige, K., Minakami, S.** (1992) Cytochrome b558, a component of the phagocyte NADPH oxidase, is a flavoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 186, 1368-75.

**Suzuki N., Suzuki S., Duncan G. S., Millar D. G., Wada T., Mirtsos C., Takada H., Wakeham A., Itie A., Li S., Penninger J. M., Wesche H., Ohashi P. S., Mak T. W., Yeh W.-C.** (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signaling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416, 750-756.

## T

**Tabeta K., Georgel P., Janssen E., Du X., Hoebe K., Crozat K., Mudd S., Shamel L., Sovath S., Goode J., Alexopoulou L., Flavell R. A., Beutler B.** (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3516-3521.

**Tajuddin T, Ryan EJ, Norris S, Hegarty JE, O'Farrelly C.** Interferon- $\alpha$  suppressed granulocyte colony stimulating factor production is reversed by CL097, a TLR7/8 agonist. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Dec;25(12):1883-90. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06281.x. PubMed PMID: 21092001.

**Takaesu G., Kishida S., Hiyama A., Yamaguchi K., Shibuya H., Irie K., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto K.** (2000) TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 5, 649-658.

**Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira.** 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.

**Takeuchi O.**, Akira S. (2001) Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 1, 625-635.

**Takeuchi O.**, Sato S., Horiuchi T., Hoshino K., Takeda K., Dong Z., Modlin R. L., Akira S. (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169, 10-14.

**Takenawa, T.**, Ishitoya, J., Homma, Y., Kato, M., Nagai, Y. (1985) Role of enhanced inositol phospholipid metabolism in neutrophil activation. *Biochem Pharmacol* 34, 1931-5.

**Teahan, C.**, P. Rowe, P. Parker, N. Totty and A. W. Segal (1987). "The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245." *Nature* 327(6124): 720-721.

**Tomai MA**, Gibson SJ, Imbertson LM et al. Immunomodulating and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463. *Antivir. Res.* 1995; 28: 253–64.

**Triantafilou K.**, Orthopoulos G., Vakakis E., Ahmed M. A., Golenbock D. T., Lepper P. M., Triantafilou M. (2005) Human cardiac inflammatory responses triggered by Coxsackie B viruses are mainly Toll-like receptor (TLR) 8-dependent. *Cell Microbiol* 7, 1117-1126.

**Tsunawaki, S.**, Mizunari, H., Nagata, M., Tatsuzawa, O., Kuratsuji, T. (1994) A novel cytosolic component, p40phox, of respiratory burst oxidase associates with p67phox and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67phox. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 1378-87.

**Tyagi, S. R.**, S. C. Olson, D. N. Burnham and J. D. Lambeth (1991). "Cyclic AMP-elevating agents block chemoattractant activation of diacylglycerol generation by inhibiting phospholipase D activation." *J Biol Chem* 266(6): 3498-3504.

## U

**Uematsu, S.** et al. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat. Immunol.* 9, 769–776 (2008).

**Ueyama, T.**, T. Tatsuno, T. Kawasaki, S. Tsujibe, Y. Shirai, H. Sumimoto, T. L. Leto and N. Saito (2007). "A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and by p47phox." *Mol Biol Cell* 18(2): 441-454.

**Ulevitch R. J.**, Tobias P. S. (1999) Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 11, 19-22.

**Underhill, D. M.**, E. Rossmagle, C. A. Lowell, and R. M. Simmons. 2005. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* 106:2543-2550.

## V

**Verdecia**, M. A., M. E. Bowman, K. P. Lu, T. Hunter and J. P. Noel (2000). "Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains." *Nat Struct Biol* 7(8): 639-643.

**Vergnaud**, S., Paclet, M.H., El Benna, J., Pocidalo, M.A., Morel, F. (2000) Complementation of NADPH oxidase in p67-phox-deficient CGD patients p67-phox/p40-phox interaction. *Eur J Biochem* 267, 1059-67.

**Vignais**, P. V. (2002). "The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism." *Cell Mol Life Sci* 59(9): 1428-1459.

**Vollmer** J, Tluk S, Schmitz C, Hamm S, Jurk M, Forsbach A, Akira S, Kelly KM, Reeves WH, Bauer S, Krieg AM. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med*. 2005; 202:1575-85.

**Volpp**, B. D., W. M. Nauseef and R. A. Clark (1988). "Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease." *Science* 242(4883): 1295-1297.

**Von Krogh** G. (2001) Management of anogenital warts (condylomata acuminata). *Eur J Dermatol* 11, 598-603; quiz 604.

## W

**Wallach**, T. M. and A. W. Segal (1996). "Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b558 of the NADPH oxidase of phagocytes." *Biochem J* 320 ( Pt 1): 33-38.

**Wang**, J. F., T. R. Jerrells and J. J. Spitzer (1996). "Decreased production of reactive oxygen intermediates is an early event during in vitro apoptosis of rat thymocytes." *Free Radic Biol Med* 20(4): 533-542.

**Ward**, R. A., M. Nakamura and K. R. McLeish (2000). "Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 mitogen-activated protein kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome b558-containing granules." *J Biol Chem* 275(47): 36713-36719.

**Witko-Sarsat** V, Lesavre P, Lopez S, Bessou G, Hieblot C, Prum B, Noël LH, Guillevin L, Ravaud P, Sermet-Gaudelus I, Timsit J, Grünfeld JP, Halbwachs-Mecarelli L. A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Jun;10(6):1224-33.

## X

**Xu** Y., Tao X., Shen B., Horng T., Medzhitov R., Manley J. L., Tong L. (2000) Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 408, 111-115.

## Y

**Yamaguchi** K., Shirakabe K., Shibuya H., Irie K., Oishi I., Ueno N., Taniguchi T., Nishida E., Matsumoto K. (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270, 2008-2011.

**Yanagisawa** S, Koarai A, Sugiura H, Ichikawa T, Kanda M, Tanaka R, Akamatsu K, Hirano T, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M. Oxidative stress augments toll-like receptor 8 mediated neutrophilic responses in healthy subjects. *Respir Res.* 2009 Jun 15;10:50.

**Yarovinsky** F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science.* 2005; 308:1626-9.

**Yoshimura**, A., Y. Hara, T. Kaneko and I. Kato (1997). "Secretion of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria." *J Periodontal Res* 32(3): 279-286.

**Yoshimura** A., Lien E., Ingalls R. R., Tuomanen E., Dziarski R., Golenbock D. (1999) Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 163, 1-5.

**Yousefi**, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I. & Simon, H. U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 16, 1438–1444 (2009)

**Yu**, L., Zhen, L., Dinanuer, M.C. (1997) Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits. *J Biol Chem* 272, 27288-94.

**Yuzawa**, S., N. N. Suzuki, Y. Fujioka, K. Ogura, H. Sumimoto and F. Inagaki (2004). "A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase." *Genes Cells* 9(5): 443-456.

## Z

**Zarembek** K. A., Godowski P. J. (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168, 554-561.

**Zhan**, S., N. Vazquez, F. B. Wientjes, M. L. Budarf, E. Schrock, T. Ried, E. D. Green and S. J. Chanock (1996). "Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex." *Blood* 88(7): 2714-2721.

**Zhang** D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*. 2004; 303:1522-6.

**Zhang**, S.Y. et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 317, 1522-1527 (2007).

**Zhao**, X., B. Xu, A. Bhattacharjee, C. M. Oldfield, F. B. Wientjes, G. M. Feldman and M. K. Cathcart (2005). "Protein kinase Cdelta regulates p67phox phosphorylation in human monocytes." *J Leukoc Biol* 77(3): 414-420.

## **ANNEXES**

**The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A.**

Pham My-Chan Dang, Houssam Raad, Riad Arabi Derkawi, Tarek Boussetta, Marie-Hélène Paclet, Sahra Amel Belambri, **Karama Makni-Maalej**, Yolande Kroviarski, Françoise Morel, Marie-Anne Gougerot-Pocidalo, Jamel El-Benna

INSERM, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon CRB3, Paris F-75018, France.

Neutrophils play a key role in host defense and inflammation through the production of superoxide anion and other reactive oxygen species (ROS) by the enzyme complex NADPH oxidase. The cytosolic NADPH oxidase component, p67phox, has been shown to be phosphorylated in human neutrophils but the pathways involved in this process are largely unknown. In this study, we show that p67phox is constitutively phosphorylated in resting human neutrophils and that neutrophil stimulation with PMA further enhanced this phosphorylation. Inhibition of the constitutively active serine/threonine phosphatases type 1 and type 2A (PP1/2A) by calyculin A resulted in the enhancement of p67phox phosphorylation. Constitutive and calyculin A-induced phosphorylation of p67phox was completely inhibited by the protein tyrosine kinase inhibitor genistein and partially inhibited by the MEK1/2 inhibitor PD98059, but was unaffected by GF109203X, wortmannin and SB203580, inhibitors of PKC, PI3K and p38MAP kinase, respectively. Two-dimensional phosphopeptide mapping revealed that constitutive and calyculin A-induced p67phox phosphorylation occurred on the same major sites. Interestingly, calyculin A enhanced formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)-induced superoxide production, while genistein inhibited this process. Taken together, these results suggest that (i) p67phox undergoes a continual cycle of phosphorylation/dephosphorylation in resting cells; (ii) p67phox phosphorylation is controlled by MEK1/2 and an upstream tyrosine kinase; (iii) PP1/2A directly or indirectly antagonize this process. Thus, these pathways could play a role in regulating ROS production by human neutrophils at inflammatory sites.

Keywords: p67phox; neutrophil; nadph oxidase; calyculin; mek; human neutrophil; nadph; kinase; oxidase; phosphorylation; tyrosine; constitutively phosphorylate; tyrosine kinase; protein tyrosine; phosphorylate;



## RESUME

### **Effet des agonistes des TLR sur la production des FRO par la NADPH oxydase des PN humains, et les mécanismes moléculaires impliqués.**

Le polynucléaire neutrophile (PN) humain est une cellule phagocytaire qui constitue une des premières barrières de défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Sa stimulation par des facteurs chimioattractants, provoque sa migration de la circulation sanguine vers le foyer inflammatoire. Dans le site inflammatoire, les PN reconnaissent l'agent pathogène par l'intermédiaire d'opsonines, des fractions résultant de l'activation du complément et par l'intermédiaire de motifs de reconnaissance conservés au cours de l'évolution des agents pathogènes qui se lient à des récepteurs de la famille Toll (Toll-like receptors ; TLR). Le contact du pathogène avec le PN va provoquer sa phagocytose et sa destruction par la libération de molécules contenues dans les granules du PN et par la production de formes réactives de l'oxygène (FRO) par un complexe enzymatique la NADPH phagocytaire composée au repos de protéines cytosoliques (p40phox, p47phox, p67phox et Rac 2) et membranaires (gp91phox et p22phox formant le cytochrome b558). Un des événements majeur de l'activation de la NADPH oxydase est la phosphorylation de certains composants cytosoliques comme la p47phox ou la p67phox ce qui conduit à la translocation de ces protéines vers le cytochrome b558 membranaire et permet d'activer l'enzyme pour la production de FRO. L'hyperactivation de cette enzyme ou son « priming » consiste en une pré-activation du PN par des agents dit « primants » tels que des cytokines (TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-1), des chimiokines comme l'IL-8, des molécules lipidiques (PAF et LTB<sub>4</sub>), ou encore des endotoxines bactériennes LPS, agoniste de TLR4. Les TLR sont des récepteurs exprimés à la surface de nombreuses cellules dont les cellules immunitaires ; ils détectent des motifs conservés au cours de l'évolution des agents pathogènes appelés PAMPs pour "pathogen-associated molecular patterns", des protéines modifiées reconnues comme étrangères, des lipides oxydés, des ligands endogènes. Quelques agonistes des TLR comme le LPS ont été décrits pour induire un priming de la production des FRO par les PN. D'autres ont été connus par leur pouvoir activateur de la NADPH oxydase des PN. Le CL097 (Imidazoquinoline : agoniste des TLR7/8) était l'agoniste des TLR induisant le plus fort effet de « priming » par les PN stimulés par le fMLP. Le CL097 induit la phosphorylation de la p47phox sur la sérine 345. Cette phosphorylation implique des MAPKinases ERK1/2 et de la p38MAPK. La phosphorylation de ce site induit le changement de conformation de la p47phox sous l'action d'une proline isomérase Pin1. Ce changement de conformation favorise la phosphorylation des autres sites (Ser-315, Ser-328) et par conséquent l'activation de la NADPH oxydase. La comparaison de l'effet du CL097 à deux agonistes reconnaissant l'un le TLR7, l'autre le TLR 8 a montré que l'action du CL097 dépendait du TLR8. Le zymosan non opsonisé (agoniste de TLR2) stimule l'activation de la NADPH oxydase des neutrophiles. IL induit la phosphorylation de la p47phox au niveau des Ser-345, -315 et -328. Ces phosphorylations font intervenir respectivement les MAPK ERK1/2 et p38, une protéine tyrosine kinase et les PKC. En plus cet agoniste active la petite protéine cytosolique Rac2, nécessaire à l'activation de la NADPH oxydase des PN. Ces données permettraient d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques de première importance afin de moduler les réponses inflammatoires pathologiques.

Mots clés : Inflammation, Neutrophiles (PN), NADPH oxydase, P47phox, TLR, Agonistes des TLR (imidazoquinolines, Zymosan), Pin1.